

The background of the cover is a fluorescence microscopy image of a cell. The cell's internal structure is stained with a blue dye, likely DAPI, which highlights the nucleus and other organelles. Several bright green spots and clusters are visible, representing the localization of a specific protein or marker, likely the SOAT transporter mentioned in the title. The overall appearance is that of a biological specimen under a microscope.

DER NADIUM-DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTER SOAT

SUBSTRATSPEKTRUM, GENETISCHE VARIANTEN IM MENSCHEN UND
EFFEKTE IN DER SOAT KNOCKOUT MAUS

JOSEFINE BENNIEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES
DR. MED. VET.
BEIM FACHBEREICH VETERINÄRMEDIZIN
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie;
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet abrufbar über

<http://dnb.ddb.de>

© 2018 by Verlag:

Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, Gießen
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-450-0

1. Auflage 2018

Verlag:

DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17
35392 Gießen
Tel.: 0641/24466
info@dvf.de
www.dvf.de

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Joachim Geyer

DER SODIUM-DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTER SOAT

SUBSTRATSPEKTRUM, GENETISCHE VARIANTEN IM MENSCHEN UND EFFEKTE IN DER SOAT KNOCKOUT MAUS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von:

JOSEFINE BENNIEN
TIERÄRZTIN AUS HENSTEDT-ULZBURG

Gießen 2018

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Geyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Hermann Willems

Tag der Disputation: 30.08.2018

Prüfungskommission: Prof. Dr. Joachim Geyer
Prof. Dr. Hermann Willems
Prof. Dr. Gerhard Schuler

INHALT

Abkürzungen.....	III
1. EINLEITUNG	1
1.1. STEROIDHORMONE	1
1.1.1. Struktur der Steroidhormone.....	1
1.1.2. Synthese der Steroidhormone	3
1.1.3. Wirkungsweise der Steroidhormone	4
1.1.4. Sulfokonjugation der Steroidhormone	4
1.1.4.1 Sulfotransferasen	5
1.1.4.2. Sulfatase Syntheseweg (<i>sulfatase pathway</i>).....	6
1.1.4.3. Steroidsulfatase (StS)	8
1.2. TRANSPORTER SULFOKONJUGIRTER STEROIDHORMONE.....	9
1.2.1. Aufnahmetransporter	9
1.2.1.1. Organic anion transporting polypeptides, OATPs.....	10
1.2.1.2. Organic anion transporters, OATs.....	12
1.2.2. Effluxtransporter	14
1.2.2.1. Multidrug resistance-associated proteins, MRPs.....	14
1.3. DER HODEN ALS STEROIDHORMON-SYNTHEISIERENDES ORGAN.....	14
1.3.1. Der Hoden als endokrines Organ, Leydig-Zellen	15
1.3.2. Der Hoden als exokrines Organ, Sertoli-Zellen und Samenkanälchen	16
1.3.2.1 Spermato-genese und Keimzellen.....	18
1.3.2.2. Stadien der Spermato-genese	18
1.3.3. Störungen der Spermato-genese	20
1.4. SODIUM-DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTER, SOAT/SOAT	21
2. ÜBERSICHT DER PUBLIKATIONEN MIT DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS.....	23
2.1. PUBLIKATION #1.....	23
2.1.1 Eigenanteil Publikation #1	24
2.2. PUBLIKATION #2.....	26
2.2.1 Eigenanteil Publikation #2	27
2.3. PUBLIKATION #3.....	28
2.3.1 Eigenanteil Publikation #3	29

3. DISKUSSION	32
3.1. <i>SLC10A6/SLC10A6</i> -GEN UND <i>SOAT/SOAT</i> -PROTEIN	32
3.2. TRANSPORTFUNKTION	33
3.3. <i>SOAT</i> : GEWEBEEEXPRESSION IN MENSCH UND MAUS	45
3.4. <i>SOAT</i> : POLYMORPHISMEN UND GENETISCHE VARIANTEN	46
3.4.1. PolyPhen.....	49
3.4.2. SIFT	50
3.4.3. Transportaktivität und Plasmamembran-Expression der <i>SOAT</i> -Varianten.....	50
3.5. <i>SOAT</i> KNOCKOUT MAUS	53
3.6. WEITERE UNTERSUCHUNGEN UND AUSBLICK	57
3.6.1. Cholesterin-Sulfat.....	57
3.6.2. Oxysterole	62
4. ZUSAMMENFASSUNG	64
5. SUMMARY	65
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	67
7. DANKSAGUNGEN	89
8. ANHANG.....	93
Publikation #1	
Publikation #2	
Publikation #3	
ERKLÄRUNG	

ABKÜRZUNGEN

[³ H]	Tritium
17 α -OH-PregS	17 α -Hydroxy-Pregnenolon-Sulfat
24OHC	24S-Hydroxycholesterin
25OHC	25-Hydroxycholesterin
27OHC	27-Hydroxycholesterol
ABC	ATP-binding Cassette
ABP	Androgen-bindendes Protein
AMH	Anti-Müller-Hormon
AnS	Androsteron-Sulfat
ASBT	Apical Sodium-dependent Bile Acid Transporter
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHS	Blut-Hoden-Schranke
BK	Brustkrebs
bp	Basenpaare
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CS	Cholesterin-Sulfat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DHTS	Dihydrotestosteron-Sulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E ₁	Estron
E ₁ S	Estron-3-Sulfat
E ₂	17 β -Estradiol
E ₂ -17S	17 β -Estradiol-17-Sulfat
E ₂ -3S	17 β -Estradiol-3-Sulfat
E ₂ -diS	Estradiol-Disulfat
E ₃	Estriol
epiAnS	Epiandrosteron-Sulfat
epiTS	Epitestosteron-Sulfat
EtOH	Ethanol
FKS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadoliberin
HVL	Hypophysenvorderlappen
hyp	Hypospermatogenese

IHC	Immunhistochemie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Kopplung
LH	Luteinisierendes Hormon
LSC	Liquid Scintillation Counting
maf	Major Allele Frequency
MetOH	Methanol
MRP	Multidrug Resistance-associated Protein
NM	<i>Neisseria meningitides</i>
NTCP	Natrium/Taurocholate Cotransporting Polypeptide
OAT	Organic Anion Transporter
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide
OAT-Syndrom	Oligoasthenoteratozoospermie
OCT	Organic Cation Transporter
PAP	Adenosin-3,5-Diphosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PAPSS	PAPS-Synthetase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PK	Prostatakrebs
Preg	Pregnenolon
PregS	Pregnenolon-Sulfat
RXLI	Rezessive X-chromosomale Ichthyose
sco	Sertoli Cell Only Syndrome
sda	Spermatidenarrest
sga	Spermatogonienarrest
<i>Slc10a6^{-/-}</i>	Soat Gen-Knockout Maus
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
SO ₄ ²⁻	Sulfat
SOAT/Soat	Sodium-dependent Organic Anion Transporter (Mensch/Tier)
StS	Steroidsulfatase
SULT	Sulfotransferase
sza	Spermatozytenarrest
T	Testosteron
TC	Taurocholat
tet	Tetracyclin
TMD	Transmembrandomäne
TS	Testosteron-Sulfat
YF	<i>Yersinia frederiksenii</i>

1. EINLEITUNG

1.1. STEROIDHORMONE

Steroidhormone sind von essentieller Bedeutung für die Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Menschen und Wirbeltieren. Sie werden in 5 Klassen eingeteilt. Man unterscheidet Androgene, Östrogene, Glucocorticoide, Mineralocorticoide und Gestagene [Simons, 2008].

Dehydroepiandrosteron (DHEA) kann als Vorstufe von sowohl Androgenen als auch Östrogenen genutzt werden und stellt das am häufigsten im menschlichen Organismus vorkommende Steroidhormon dar. Die wichtigsten Vertreter der Androgene, auch „männliche“ Geschlechtshormone genannt, sind Testosteron (T) und 5 α -Dihydrotestosteron (DHT).

Zu den natürlich vorkommenden Östrogenen, den „weiblichen“ Geschlechtshormonen, gehören Estron (E₁), Estradiol (E₂) und Estriol (E₃). Geschlechtshormone steuern das Wachstum und die Ausbildung primärer und sekundärer Geschlechtsmerkmale [Silverthorn, 2009].

Auch im weiblichen Organismus wird Testosteron gebildet, sowie im männlichen Organismus Östrogene. Dies geschieht jedoch in der Regel in wesentlich geringeren Konzentrationen, sodass sich die mundartlichen Begriffe der „männlichen“ und „weiblichen“ Geschlechtshormone etabliert haben [Burger, 2002]. Ein weiteres wichtiges Geschlechtshormon ist das Progesteron, das auch Gelbkörperhormon genannt wird. Es gehört zu den Gestagenen und trägt maßgeblich zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, sowie zur Steuerung der Uterusfunktionen bei [Allen, 1941; Niswender et al., 2000].

Zu den Glucocorticoiden, welche den Glucose Stoffwechsel steuern, gehören vor allem Cortisol und Cortikosteron. Die beiden bedeutendsten Mineralocorticoide, Aldosteron und Desoxycorticosteron, regulieren den Elektrolythaushalt [Häggröm und Richfield, 2014].

1.1.1. STRUKTUR DER STEROIDHORMONE

Alle Steroidhormone werden vom Cholesterin (englisch Cholesterol) abgeleitet und besitzen die gleiche, typische Grundstruktur, das Steroidgerüst. Dieses Gerüst, auch Steran genannt, besteht aus 17 Kohlenstoffatomen, die sich zu drei Cyclohexanringen (Ringe A, B, C) und einem Cyclopentanring (Ring D) zusammenlagern. Die unterschiedlichen Steroidhormone werden auch nach Anzahl ihrer

Kohlenstoffatome (inklusive Seitenketten) in C21- (Gestagene und Glucocorticoide), C19- (Androgene) und C18-Steroide (Östrogene) klassifiziert. Die für die biologische Wirksamkeit der Steroidhormone wichtigen Substituenten sind an den Positionen 3, 10, 13 und 17 angelagert. Typisch für die Struktur der Glucocorticoide ist zum Beispiel eine 17 α -Hydroxylgruppe [Schmitt und Rousseau, 1979].

Moleküle liegen in meist energetisch möglichst günstiger Konformation vor. Durch die 6 chiralen Kohlenstoffatome an den jeweiligen Ring-Verbindungsstellen sind theoretisch 64 verschiedene Stereoisomere denkbar, von denen allerdings nur sehr wenige natürlicherweise auftreten.

Die Ringe A/B, B/C und C/D können jeweils in *cis*- oder in *trans*-Konformation miteinander verknüpft sein. Die Ringverknüpfung B/C der natürlichen Steroide zeigt immer eine *trans*-Konformation. Die Ringverknüpfungen B/C und C/D liegen bei Steroidhormonen und auch bei Gallensäuren immer in der energetisch günstigen *trans*-Konformation vor [The Nomenclature of Steroids, 1989].

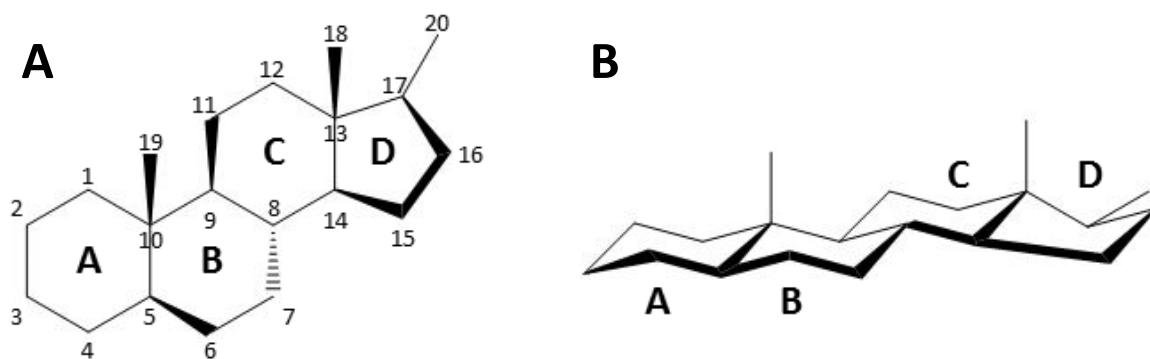


Abb. 1: Grundgerüst der Steroidhormone

(A) Steran (tetracyclisches Kohlenstoffskelett Hexadecahydro-cyclopenta[*a*]phenanthren)

(B) Sterangerüst in *trans-trans-trans*-Konformation

1.1.2. SYNTHESE DER STEROIDHORMONE

Die Vorstufe der Steroidhormone, das Cholesterin, wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder *de novo* aus Acetyl-CoA, meist in der Leber aber auch in anderen Geweben, gebildet. Das lipophile Cholesterin wird zum Transport im Blut an Lipoproteine (*low density lipoprotein*, LDL) gebunden und in der Nebennierenrinde, sowie in den weiblichen und männlichen Gonaden, zu den verschiedenen Steroidhormonen weiterverarbeitet. Die Biosynthese beginnt mit der Oxidation von Cholesterin über Pregnenolon (Preg) zu Progesteron. Im weiteren Verlauf finden eine Hydroxylierung an Position 17 α , sowie die Abspaltung der Cholesterin-Seitenkette statt. Diese Reaktionen laufen in den Mitochondrien und dem glatten endoplasmatischen Retikulum verschiedener endokriner Organe ab [Häggström und Richfield, 2014].

Die Mineralocorticoide und Glucocorticoide werden in der Nebennierenrinde (NNR) gebildet. Androgene entstehen sowohl in der NNR, als auch im Hoden, Östrogene und Gestagene in den Ovarien und der Plazenta. Von ihrem Bildungsort gelangen die Steroidhormone über den Blutkreislauf zu den Zielorganen [Ruiz-Cortés, 2012].

Synthese und Ausschüttung von Steroidhormonen aus den endokrinen Organen unterliegen klassischerweise der regulatorischen Kontrolle des Hypothalamus. Die Steuerung erfolgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und sog. Releasing-Hormone (Liberine) [Gonzalez et al., 1991; Ehrhart-Bornstein et al., 1998].

Da die lipophilen Steroidhormone schlecht wasserlöslich sind, werden sie zu Transportzwecken in der Blutbahn nicht-kovalent an Serumproteine gebunden. Auf diese Weise sind sie vor einem schnellen Abbau geschützt und besitzen eine wesentlich längere Halbwertszeit [Ruiz-Cortés, 2012]. Der Abbau der Steroidhormone erfolgt über die Leber und in den Tubuluszellen der Niere. Die Ausscheidung erfolgt unverändert oder in Form von Metaboliten (meist Sulfaten oder Glucuroniden) über Galle und Urin [Träger, 1977].

Steroide sind in der Natur weit verbreitet und kommen auch im Pflanzenreich vor, hier zum Beispiel als Phytohormone, zu denen auch die Herzglycoside zählen [Zeelen, 1995]. Herzglycoside weisen eine *cis-trans-cis* Anordnung der Steroidringe auf [Heasley, 2012].

1.1.3. WIRKUNGSWEISE DER STEROIDHORMONE

Freie Steroidhormone können aufgrund ihrer Lipophilie via Diffusion in die Zielzellen gelangen und intrazellulär an nukleäre Steroidrezeptoren binden. Nach klassischer Vorstellung binden Steroidhormone an die Ligandenbindungsdomäne (LBD) des jeweiligen Rezeptors. Der Rezeptor-Steroid-Komplex bindet wiederum an spezifische, biologisch aktive DNA-Sequenzen, die sogenannten Hormon-Response-Elemente (HREs). Durch diese Interaktion wird die Genexpression von Zielgenen reguliert [Beato, 1989; Simons, 2008]. Der Rezeptor-Steroid-Komplex wirkt also als Transkriptionsaktivator.

1.1.4. SULFOKONJUGATION DER STEROIDHORMONE

Hydrophobe Steroidhormone können in verschiedenen Geweben des Körpers sulfokonjugiert werden. Durch die Sulfokonjugation erhalten die Moleküle eine negative Ladung und ihre Wasserlöslichkeit wird verbessert [Müller *et al.*, 2015]. Dies erleichtert wiederum ihren Transport über den Blutkreislauf und ermöglicht ihre Ausscheidung über Galle und Urin. Aus diesem Grund wurden sulfokonjugierte Steroide lange Zeit lediglich als unwirksame, metabolische Endprodukte angesehen. Tatsächlich haben konjugierte Steroidhormone keinerlei Wirkung mehr an nukleären Steroidrezeptoren. Interessanterweise ist jedoch die Konzentration der sulfokonjugierten Steroidhormone im Blut wesentlich höher als die der freien Formen. So ist z. B. der Serumspiegel von Estron-3-Sulfat (E₁S) 10-fach höher als der des unkonjugierten Estron oder Estradiol [Samojlik *et al.*, 1982]. Darüber hinaus ist die Halbwertszeit des E₁S im Blut im Vergleich zum Estron bis zu 9-mal länger [Ruder *et al.*, 1972].

In den letzten zwei Jahrzehnten konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass sulfokonjugierte Steroide als zirkulierendes Reservoir für die periphere Bildung bioaktiver Hormone fungieren können [Labrie *et al.*, 2003]. Sulfatierung und Desulfatierung können dabei als gegenläufige biologische Prozesse angesehen werden, welche die Steroidhormonwirkung in einer Vielzahl von Steroid responsiven Geweben regulieren [Müller *et al.*, 2015].

Die Sulfokonjugation von Hydroxylgruppen der Steroidhormone wird durch die Enzyme aus der Familie der zytosolischen Sulfotransferasen katalysiert [Lindsay *et al.*, 2008].

Das für die Sulfokonjugation benötigte Sulfat (SO_4^{2-}) wird dabei aus der Nahrung und dem intrazellulären Stoffwechsel von schwefelhaltigen Aminosäuren, einschließlich Methionin und Cystein, gewonnen. Das Sulfuryldonor-Cosubstrat für die SULT-katalysierte Reaktion ist das 3-Phosphoadenosin-5-phosphosulfat (PAPS) [Secky *et al.*, 2013]. PAPS agiert als universeller Sulfuryldonor im Organismus. Sein ubiquitäres Auftreten als Sulfuryldonor wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass die dreidimensionalen Strukturmerkmale der Bindungsstelle für PAPS unter den unterschiedlichen Sulfotransferasen hoch konserviert sind [Negishi *et al.*, 2001]. Die Biosynthese von PAPS erfolgt in einem zweistufigen Prozess, der durch die PAPS-Synthetase (PAPSS) durchgeführt wird [Lyle *et al.*, 1994]. Bei Menschen wurden zwei Isoformen von PAPSS identifiziert und charakterisiert, PAPSS1 und PAPSS2 [Kurima *et al.*, 1999; Fuda *et al.*, 2002]. Die Reaktionsprodukte nach der Sulfokonjugation der Steroidhormone sind das jeweils sulfokonjugierte Steroidhormon und Adenosin-3,5-Diphosphat (PAP) [Duffel, 2010].

1.1.4.1 SULFOTRANSFERASEN

Die Sulfotransferasen (SULTs) katalysieren die Transferreaktion der Sulfatgruppe vom universellen Sulfuryldonor PAPS zur Akzeptorgruppe zahlreicher Substrate, wie z. B. der Steroidhormone. Diese Reaktion, die oft auch als Sulfuryltransfer, Sulfatierung oder Sulfokonjugation bezeichnet wird, wird häufig und in vielen Spezies von Bakterien bis hin zu Menschen beobachtet und spielt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen biologischen Prozessen wie Zellkommunikation, Abwehr, Wachstum und Entwicklung [Negishi *et al.*, 2001].

Sulfotransferasen sind eine große Proteinfamilie, die in membrangebundene, Golgi-assoziierte Enzyme und lösliche, cytoplasmatische Sulfotransferasen eingeteilt wird [Hemmerich *et al.*, 2004; Goettsch *et al.*, 2006]. Golgi-assoziierte Sulfotransferasen sind für die Sulfokonjugation von Proteinen, Kohlenhydraten und Proteoglykanen verantwortlich, während cytoplasmatische Sulfotransferasen hauptsächlich hydrophobe, niedermolekulare Substanzen wie Phenole, Xenobiotika und Steroide modifizieren [Müller *et al.*, 2015]. Obwohl die Sequenzkonservierung zwischen den verschiedenen Sulfotransferasen gering ist, sind ihre Faltung und katalytischen Eigenschaften, einschließlich der Bindung von PAPS, hoch konserviert. Es gibt speziesabhängig

verschiedene Sulfotransferasen, die mit der Steroidsulfokonjugation assoziiert sind, z. B. SULT1A1, SULT1E1, SULT2A1 sowie die zwei Isoformen des SULT2B1-Gens, SULT2B1a und SULT2B1b [Strott, 2002]. SULT2B1a bevorzugt Pregnenolon als Substrat, wohingegen SULT2B1b Cholesterin vorzieht [Fuda et al., 2002]. Die Isoform SULT1E1 ist als Östrogen-Sulfotransferase bekannt, da sie die Sulfokonjugation von E₁ und E₂ mit hoher Effizienz bei physiologischen Konzentrationen katalysiert. Die Sulfokonjugation der Androgene wird hauptsächlich durch die Isoform SULT2A1 erreicht [Lindsay et al., 2008].

1.1.4.2. SULFATASE SYNTHESWEG (*SULFATASE PATHWAY*)

Da sulfokonjugierte Steroidhormone aufgrund ihrer Hydrophilie und Ladung nicht via Diffusion Zellmembranen überwinden können, werden sie durch spezifische Transportproteine über die Plasmamembran transportiert (siehe Abb. 2). Innerhalb der Zelle kann die SO₄²⁻-Gruppe durch die mikrosomale Steroidsulfatase (StS) vom Molekül abgespalten werden und das auf diese Weise reaktivierte Steroidhormon kann wiederum an nukleäre Steroidrezeptoren binden. Dieser als *sulfatase pathway* beschriebene Prozess entspricht also einer Reaktivierung bzw. einem Recycling der im Kreislauf zirkulierenden, inaktiven sulfokonjugierten Steroidvorstufen zu biologisch wirksamen Steroidhormonen.

Der *sulfatase pathway* ist unter anderem beim hormonabhängigen Mammakarzinom pathophysiologisch von Bedeutung [Labrie et al., 2003; McNamara und Sasano, 2015; Müller et al., 2015; Ziegler et al., 2015]. Hormonabhängige Mammakarzinome proliferieren hormonabhängig und zeigen im Vergleich zu benachbartem, normalem Brustgewebe häufig erhöhte intratumorale Östrogenkonzentrationen [Chetrite et al., 2000]. Es gibt zwei Hauptwege für die Bildung von aktiven Östrogen im hormonabhängigen Mammakarzinom: Desulfatierung von sulfatierten Estron oder Estradiol über die StS und Androgen-Aromatisierung. Die StS-Aktivität kann jedoch im Brustkrebsgewebe 50-200 Mal höher sein als die Aromatase-Aktivität [Pasqualini et al., 1996]. Außerdem wird StS-mRNA häufig in Brusttumoren nachgewiesen, während die Aromatase-Spiegel im Vergleich niedrig sind [Suzuki et al., 2009]. Dies legt die Vermutung nahe, dass StS der Hauptantrieb für die lokale Estron-Produktion bei hormonabhängigem Brustkrebs sein könnte

[*Santner et al., 1984; Wood et al., 2011*]. Für das hormonabhängige Mammakarzinom wurde darüber hinaus gezeigt, dass die Bildung von Estron mittels Reaktivierung aus dem konjugierten E₁S deutlich größer ist als die Bildung von Estron *via* Neusynthese [*Santner et al., 1984; Wood et al., 2011*].

Auch im Hoden verschiedener Spezies scheinen der *sulfatase pathway* und die lokale Synthese von aktiven Steroidhormonen aus den inaktiven, sulfokonjugierten Vorstufen eine Rolle zu spielen. Die im Hoden produzierten Androgene wirken über den nukleären Androgenrezeptor primär in den Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und den peritubulären Zellen [*Walker, 2009*]. Außerdem wurde gezeigt, dass im Hoden auch sulfokonjugierte Steroidhormone wie Pregnenolon-Sulfat (PregS), Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS) und Testosteron-Sulfat (TS) synthetisiert werden können [*Laatikainen et al., 1971; Ruokonen et al., 1972*]. Darüber hinaus konnten Payne et al. zeigen, dass die Testosteronsynthese im Hoden auch durch Desulfatierung und Umwandlung von PregS, DHEAS und Androstendiol-3-Sulfat zustande kommt und dass die StS in diesem Fall als Schlüsselenzym fungiert [*Payne et al., 1971; Payne et al., 1973; Payne und Jaffe, 1975; Ruokonen, 1978*].

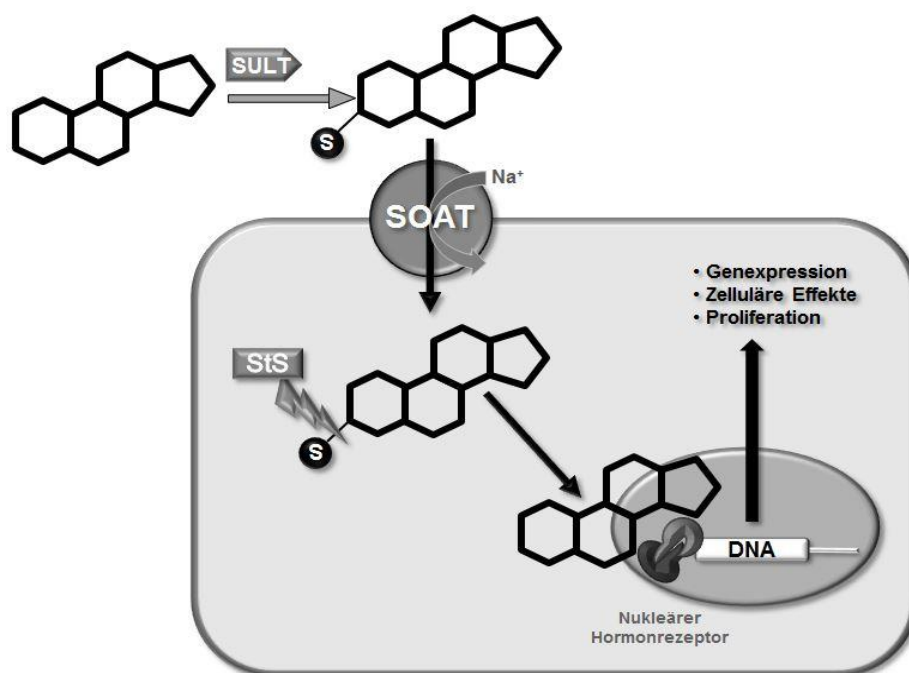


Abb. 2: Intrakrine Steroidsynthese: Sulfatase Syntheseweg (*sulfatase pathway*)

Steroidhormone werden über die Sulfotransferase (SULT) sulfokonjugiert und damit inaktiviert. Die sulfokonjugierten Steroidhormone können nicht *via* Diffusion in die Zellen gelangen, sondern werden z. B. über den *sodium-dependent organic anion transporter* (SOAT) im Cotransport mit Natrium (Na⁺) in die Zelle aufgenommen. Innerhalb der Zelle trennt die Steroidsulfatase (StS) die Sulfatgruppe (S) vom Molekül ab. Das auf diesem Weg reaktivierte Steroidhormon kann nun an den nukleären Steroidhormonrezeptor binden und biologische Prozesse anstoßen.

1.1.4.3. STEROIDSULFATASE (StS)

Die Sulfatase-Enzymfamilie katalysiert die Hydrolyse von Sulfatesterbindungen einer Vielzahl von Substraten. Die primären Hormonsubstrate der StS sind E₁S, DHEAS, PregS und Cholesterin-Sulfat (CS). Aus diesem Grund stellt dieses Enzym einen der Hauptwege für die Regeneration biologisch aktiver Steroidhormone dar, sowohl in steroidalen als auch in nicht steroidalen Geweben [Rizner, 2016].

Die StS besitzt eine hydrophobe Domäne und ist ein membrangebundenes, mikrosomales Enzym, das vor allem im Lumen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums (RER) lokalisiert ist, wo es Homodimere bildet [Suzuki *et al.*, 2011]. StS kommt ubiquitär im menschlichen Gewebe vor, wobei die größte mRNA-Expression und Aktivität in der Plazenta auftritt [Warren und French, 1965]. Interessanterweise ändert sich die StS-Aktivität während der Pubertät, unterscheidet sich zwischen Männern und Frauen und ist bei präpubertären Frauen am höchsten [Cuevas-Covarrubias *et al.*, 1993]. Darüber hinaus ist StS häufig in verschiedenen tumorösen Geweben, wie z. B. in Brustkrebsgeweben erhöht [Santner *et al.*, 1984; Utsumi *et al.*, 2000]. Außerdem kann es durch einen Mangel an StS, die auch in der Haut exprimiert wird, zur Ausprägung der rezessiven X-chromosomalen Ichthyose (RXLI) durch vermehrte Cholesterin-Sulfat Einlagerung im *stratum corneum* der Haut kommen [Hernandez-Martin *et al.*, 1999]. Diese Krankheit stellt einen der häufigsten, angeborenen Stoffwechselfehler des Menschen dar [Alperin und Shapiro, 1997]. Ein Anstieg der StS Genexpression und der StS Aktivität kann dagegen zur Entstehung bzw. zur Proliferation von Brusttumoren führen [Utsumi *et al.*, 2000; Al Sarakbi *et al.*, 2006]. Beim Menschen wurde StS als ein vielversprechendes pharmakologisches Target für Östrogen- und Androgendeprivationstherapien bei hormonellen Erkrankungen identifiziert [Stanway *et al.*, 2007].

1.2. TRANSPORTER SULFOKONJUGierter STEROIDHORMONE

1.2.1. AUFNAHMETRANSPORTER

Es sind mehrere Transportproteine bekannt, welche die Aufnahme der hydrophilen und damit diffusionsunfähigen, konjugierten Steroidhormone in die Zelle ermöglichen [Burckhardt und Burckhardt, 2003; Hagenbuch und Meier, 2004; Geyer *et al.*, 2006].

Sulfatierte Steroidhormone sind chemisch gesehen organische Anionen. Transporter für organische Anionen können in zwei Gruppen eingeteilt werden: (I) Aufnahme-Transporter und (II) Effluxtransporter. Erstere gehören meist in die Familie der sog. Solute Carriers (SLC-Familie), letztere in die Familie der *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter [Roth *et al.*, 2012]. Zu den SLC-Transporter gehören folgende Transporter für organische Anionen: *organic anion transporting polypeptides* (OATPs, Genfamilie SLCO) sowie *organic anion transporters* (OATs,

Genfamilie *SLC22*). Typisch für diese Transporter ist der Transport von endogenen Substanzen wie konjugierten Steroiden oder Neurotransmittern sowie von Xenobiotika und Arzneistoffen [Obaidat et al., 2012]. Einzelne Mitglieder dieser beiden SLC-Familien werden im Wesentlichen in jedem Epithel des Körpers exprimiert [Roth et al., 2012]. OATPs transportieren dabei eher größere hydrophobe organische Anionen, zu denen auch die sulfokonjugierten Steroidhormone gehören, während die OATs eher für den Transport von kleinen hydrophilen organischen Anionen zuständig sind.

1.2.1.1. ORGANIC ANION TRANSPORTING POLYPEPTIDES, OATPs

In den letzten Jahren wurden mehrere Mitglieder der OATP-Familie unter anderem als Transporter für sulfokonjugierte Steroide identifiziert: Für **OATP1A2** konnte der Transport von E₁S nachgewiesen werden [Lee et al., 2005], für **OATP1B1** der Transport von E₁S [Hirano et al., 2004] und von DHEAS [Abe et al., 1999; Hsiang et al., 1999; Cui et al., 2001; Kullak-Ublick et al., 2001], für **OATP1B3** der Transport von E₁S [Kullak-Ublick et al., 2001; Nozawa et al., 2004b; Nozawa et al., 2005] sowie der Transport von DHEAS [König et al., 2000; Cui et al., 2001; Kullak-Ublick et al., 2001], für **OATP2B1** der Transport von E₁S [Tamai et al., 2001; Pizzagalli et al., 2003; Nozawa et al., 2004a; Hirano et al., 2006] und von PregS [Grube et al., 2006] sowie für **OATP1C1**, **OATP3A1_v1**, **OATP4A1** und **OATP4C1** der Transport von E₁S [Tamai et al., 2000; Pizzagalli et al., 2002; Nozawa et al., 2004a; Grube et al., 2006; Hirano et al., 2006; Yamaguchi et al., 2010].

Für alle OATPs/Oatps (OATP als Abkürzung für die humanen OATs, Oatp entsprechend für die tierischen Homologe) wird zurzeit ein Strukturmodell mit 12 TMDs angenommen [Hagenbuch und Meier, 2003]. Sie wirken als ATP- und Natrium-unabhängige Transportproteine [Jacquemin et al., 1994; Kullak-Ublick et al., 1994; Noe et al., 1997; Walters et al., 2000] und können eine Vielzahl verschiedener, amphipathischer, organischer Verbindungen durch die Zellmembran schleusen. Zu ihren Substraten zählen Gallensalze, Steroidkonjugate, Schilddrüsenhormone, anionische Oligopeptide, sowie zahlreiche Pharmaka und Xenobiotika.

Nach dem von Hagenbuch und Meier im Jahr 2004 eingeführten System teilen sich die OATPs in sechs Familien (mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 40%) auf, die wiederum verschiedenen

Subfamilien (mit einer Aminosäuresequenz-Identität von 60%) enthalten. Die einzelnen Familien werden mit den Ziffern 1 bis 6 nummeriert, während Subfamilien mit Hilfe der Buchstaben A, B und C unterschieden werden. Die nach Zahl und Buchstabe im Namen folgende Nummerierung bezieht sich dann chronologisch auf den Zeitpunkt der Entdeckung des jeweiligen Proteins (z. B. OATP1B1 des Menschen, Oatp1b2 der Ratte und OATP1B3 des Menschen), zumindest dann, wenn keine klare Orthologie vorliegt. Orthologe OATPs/Oatps werden dagegen bei Mensch und Tier mit dem gleichen Namen bezeichnet (z. B. OATP2B1/Oatp2b1). Die meisten OATPs/Oatps werden in mehreren verschiedenen Geweben (meist epithelialen Ursprungs) exprimiert, allerdings gibt es auch einige Vertreter, die nur in bestimmten Organen vorkommen. Ein Beispiel für einen ubiquitär auftretenden OATP ist OATP2A1, dessen mRNA sowohl in Gehirn, Kolon, Herz, Leber als auch in der Niere nachgewiesen werden konnte, sowie in Ovar, Lunge, Pankreas, Prostata, Skelettmuskel, Milz und Dünndarm [Schuster, 2002]. OATP1B3 hingegen wird exklusiv in der basolateralen Membran der Leber exprimiert [Abe et al., 1999; Hsiang et al., 1999; König et al., 2000; Obaidat et al., 2012]. In einzelnen Organen können allerdings auch verschiedene OATPs exprimiert werden. So konnten im Hoden z. B. OATP1A2 [Kullak-Ublick et al., 1995; Steckelbroeck et al., 2004], OATP1C1 [Pizzagalli et al., 2002] und OATP3A1 [Adachi et al., 2003; Huber et al., 2007] nachgewiesen werden. Letzterer kommt in zwei Spleißvarianten vor. Die erste, OATP3A1_v1, wurde besonders in Keimzellen nachgewiesen, während die andere, OATP3A1_v2, vorwiegend in Sertoli-Zellen gefunden wurde.

OATPs/Oatps transportieren ihre Substrate ATP- und Natrium-unabhängig [Jacquemin et al., 1994; Kullak-Ublick et al., 1994; Noe et al., 1997; Walters et al., 2000]. Ihr genauer Transportmechanismus ist noch nicht endgültig aufgeklärt. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass der OATP/Oatp-vermittelte Transport pH-abhängig und elektroneutral ist [Satlin et al., 1997]. Außerdem wurde beschrieben, dass OATPs/Oatps als Anionenaustauscher fungieren können, indem sie die Aufnahme organischer Verbindungen an den Efflux von z. B. Bikarbonat, Glutathion- oder Glutathion-Konjugaten koppeln [Shi et al., 1995; Satlin et al., 1997; Li et al., 2000; Li et al., 1998]. Obwohl dies noch nicht für alle OATPs/Oatps gezeigt wurde, können OATPs/Oatps als bidirektionale Transportsysteme angesehen werden. Entsprechend wäre die Richtung des Transports vom lokalen Substratgradienten abhängig [Hagenbuch und Meier, 2004].

1.2.1.2. ORGANIC ANION TRANSPORTERS, OATs

Gründungsmitglied der Familie der Transporter für organische Anionen (OATs) ist der OAT1, ehemals basolateraler p-Aminohippurat (PAH)-Transporter, welcher ursprünglich aus dem proximalen Nierentubulus der Ratte isoliert wurde [Reid et al., 1998; Sekine et al., 2000]. Mittlerweile sind zehn Mitglieder der OAT-Familie bekannt, welche mit Ziffern durchnummeriert werden (OAT1, OAT2, OAT3, etc.) [Roth et al., 2012]. Am besten untersucht sind bisher OAT1, OAT2, OAT3 und OAT4, sowie ein OAT der Flunder (frOat) [Sekine et al., 2000]. Auch für OATs wird ein Modell mit 12 TMDs angenommen und auch sie vermitteln, wie die OATPs, einen Natrium-unabhängigen Transport. Ferner sind die OATs multispezifisch, was bedeutet, dass sie als Substrat sowohl endogene Anionen, wie z. B. zyklische Nukleotide, Prostaglandine, Harnsäure und Dicarboxylate, als auch verschiedene exogene Anionen, wie z. B. anionische Arzneistoffe, als Substrate erkennen.

Einige Mitglieder der OAT-Familie wurden in Leber, Gehirn und Plazenta detektiert. Bevorzugter Expressionsort ist jedoch die Niere. Damit ermöglichen OATs einen renalen Sekretionsweg für organische Anionen. Außerdem sind sie an der Verteilung organischer Anionen im Organismus beteiligt [Sekine et al., 2000].

OAT1 wird überwiegend in der Niere und schwach im Gehirn exprimiert [Sekine et al., 1997]. Die funktionelle Charakterisierung von OAT1 wurde zunächst mit PAH als Substrat durchgeführt. Die Aufnahme von PAH ist Natrium-unabhängig und wird durch einen nach außen gerichteten Konzentrationsgradienten von α -Ketoglutarat oder Glutarat erhöht [Köpsell, 2013]. OAT1 ist ein Anion/Dicarboxylat-Austauscher, zu dessen Substraten Tetracyclin, Acyclovir [Uwai et al., 2007], Cimetidin, Ranitidin, Furosemid, Ibuprofen und sulfokonjugierte Flavonoidkonjugate gehören [Rizwan und Burckhardt, 2007; Wong et al., 2011; Köpsell, 2013]. OAT2 (früher *novel liver transporter*, NLT) wird vorwiegend in den sinusoidalen Membranen der Leber und nur schwach in der Niere exprimiert [Simonson et al., 1994]. Expression, Geschlechtsabhängigkeit und Expressionsort von OAT2 sind allerdings spezieabhängig [Köpsell, 2013]. Der humane OAT2 vermittelt den zellulären Efflux von Glutamat und transportiert darüber hinaus eine Vielzahl von Substanzen, wie z. B. Glutarat [Kobayashi et al., 2005], Harnsäure [Sato et al., 2010], Purin und Pyrimidin Nucleobasen, cAMP, Prostaglandine, E₁S, sowie DHEAS und α -Ketoglutarat [Rizwan und Burckhardt, 2007; Srimaroeng et al., 2008]. OAT3 wird sowohl in der Leber, als auch in Niere und

Gehirn, sowie schwach im Auge exprimiert [Kusuhara et al., 1999], während OAT4 in Plazenta und Niere auftritt [Cha et al., 2000]. In diesen beiden Lokalisationen vermittelt OAT4 hochaffin den Transport von E₁S, DHEAS und Ochratoxin A. Im Vergleich zu den anderen OAT-Isoformen scheint das Substratspektrum von OAT4 relativ beschränkt zu sein [Sekine et al., 2000]. Über menschliches OAT5 ist wenig bekannt, seine Expression konnte allerdings in der Leber gezeigt werden [Sun et al., 2001; Roth et al., 2012]. Sun et al. fanden heraus, dass der Oat5 der Ratte nur etwa 55% Sequenzidentität im Vergleich mit dem menschlichen OAT5 aufweist. Aus diesem Grund wurde das Homolog der Ratte als *SLC22A19* bezeichnet, wobei die menschliche Form den systematischen Namen *SLC22A10* behielt [Emami Riedmaier et al., 2012]. OAT6 bzw. *SLC22A20* wurde bisher nur aus der Maus kloniert und charakterisiert [Monte et al., 2004; Schnabolk et al., 2006; Köpsell, 2013]. Der Oat6 der Maus ist ein Anion/Dicarboxylat-Austauscher, dessen Expression in der Riechschleimhaut nachgewiesen werden konnte und der damit eine Rolle bei der Geruchswahrnehmung spielen könnte [Köpsell, 2013]. OAT7 wird ausschließlich in der adulten und fetalen Leber, in der basolateralen Membran der Hepatozyten, exprimiert [Shin et al., 2007; Roth et al., 2012]. OAT7 vermittelt die Aufnahme von E₁S, DHEAS und Butyrat [Shin et al., 2007]. Im Vergleich mit den anderen humanen OAT-Subtypen weist OAT7 eine spezifischere Substratelektivität einschließlich der Sulfat-Konjugate auf [Köpsell, 2013]. Tatsächlich zeigt OAT7 nur etwa 5 bis 46% Sequenzidentität verglichen mit den Sequenzen von OAT1-4 [Emami Riedmaier et al., 2012]. Der humane OAT10 weist die höchste Expression in der Niere auf, gefolgt von Gehirn, Herz, Dünndarm und Kolon [Nishiwaki et al., 1998; Bahn et al., 2008]. Der Oat10 der Ratte wurde in der Bürstensaummembran der proximalen Nierentubuli lokalisiert [Köpsell, 2013]. OAT10 wurde 1998 aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit als OCT identifiziert und anfänglich als *organic cation transporter like-3* (ORCTL3) bezeichnet [Nishiwaki et al., 1998; AbuAli und Grimm, 2014]. Bahn et al. fanden allerdings statt der erwarteten organischen Kationen eine Aufnahme von organischen Anionen. Basierend auf Substratstudien und Proteinsequenz-Alignments aller bekannten OCTs und OATs, wurde hORCTL3 schließlich als OAT klassifiziert und in OAT10 umbenannt [Bahn et al., 2008; Emami Riedmaier et al., 2012]. Zu seinen Substraten gehören Nicotinat, Lactat, Harnsäure, Succinat und Glutathion, sowie Cyclosporin A und Pyrazinoat [Köpsell, 2013]. Die Subtypen OAT8 und OAT9 wurden bislang noch nicht charakterisiert.

1.2.2. EFFLUXTRANSPORTER

1.2.2.1. MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEINS, MRPs

Neben den OATPs und OATs, welche wie beschrieben die Aufnahmen von Substanzen in die Zelle vermitteln, gibt es auch Transporter, die für den Efflux, also das Herausschleusen von Substanzen aus der Zelle verantwortlich sind. Im Falle der sulfokonjugierten Steroidhormone sind hier besonders die *multidrug resistance-associated proteins* (MRPs) zu nennen.

MRPs gehören zur Familie der *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter und können Moleküle über die Plasmamembran sowie über die Membranen intrazellulärer Vesikel transportieren. Die Transportaktivität der ABC-Transporter wird energetisch durch die Bindung und Hydrolyse von ATP angetrieben, was die notwendigen Protein-Konformationsänderungen und damit die Translokation der Substrate ermöglicht [Cole, 2014].

MRPs fungieren als multispezifische Transporter. Zu ihren Substraten gehören unterschiedliche Glutathionkonjugate, Gallensalze, Glucuronsäure- und Sulfat-Konjugate sowie weitere organische Anionen [Deeley und Cole, 1997; Sodani et al., 2012]. Damit spielen MRPs auch für den Transport von sulfokonjugierten Steroidhormonen eine Rolle.

Hartmann et al. konnten die Expression verschiedener MRPs in Sertoli-Zellen des Hodens nachweisen. Damit könnten sulfokonjugierte Steroide an der sonst undurchlässigen Blut-Hoden-Schranke vorbei, durch Sertoli-Zellen in Richtung Keimzellen transportiert werden [Hartmann et al., 2016].

1.3. DER HODEN ALS STEROIDHORMON-SYNTHEISIERENDES ORGAN

Der Hoden ist das wichtigste Steroidhormon-bildende Organ des männlichen Körpers. Die Bezeichnung „*testis*“ für diesen Körperteil entwickelte sich aus einem altertümlichen, römischen Ritual, in dem sich Männer beim Schwören eine Hand auf das Genital legten. „*Testis*“ bedeutet übersetzt „Zeuge“ und so wurde das männliche Privileg vor Gericht sprechen zu dürfen der Namensgeber für dieses exklusiv männliche Organ in den Anatomie-Büchern des Altertums

[Silverthorn, 2009]. Dass „Zeuge“ etymologisch nicht allzu weit entfernt von „zeugen“ zu sein scheint, mag Zufall sein.

Der Hoden liegt bei den meisten Tieren, sowie beim Mensch, außerhalb des Körpers und ist ein paariges, meist eiförmiges Organ mit einer festen, fibrinösen, äußeren Kapsel. Innerhalb der Kapsel befindet sich eine Vielzahl von Kompartimenten-bildenden Samenkanälchen. Zwischen den Kanälchen liegt interstitielles Gewebe, welches die Blutgefäße und die Leydig-Zellen umschließt. Die Samenkanälchen vereinigen sich zum *Epididymis*, dem Nebenhoden, der außerhalb der Hodenkapsel einen Strang bildet. Die Übergangsstelle bildet der Nebenhodenkopf, an den sich der Nebenhodenkörper anschließt, der in den Nebenhodenschwanz und schließlich in den *ductus deferens* übergeht. Der *ductus deferens* verläuft in Richtung Abdomen und mündet letztendlich in die Urethra [Silverthorn, 2009].

1.3.1. DER HODEN ALS ENDOKRINES ORGAN, LEYDIG-ZELLEN

Der Steroidhormon-produzierende Teil des Hodens, und somit sein endokriner Part, besteht vor allem aus den im Interstitium gelegenen Leydig-Zellen. Ihre Aktivität und somit die Androgen-Produktion beginnt bereits im Fetus-Alter, wenn sich die männlichen Geschlechtsmerkmale ausbilden. Innerhalb dieser Aktivitätsphase wird auch von „fetalen Leydig-Zellen“ gesprochen.

Nachdem die Maskulinisierung des Körpers abgeschlossen ist, treten die Leydig-Zellen in einen Aktivitäts-Stopp, welcher erst wieder mit dem Eintritt in die Pubertät aufgehoben wird [Silverthorn, 2009]. Ab diesem Zeitpunkt spricht man auch von „adulten Leydig-Zellen“. Histologisch stellen diese sich als große Zellen mit einem dezentralen, ovoid bis runden Kern dar. In ihrem Zytoplasma sind nur wenige Lipidtröpfchen erkennbar, was mit der Steroidbiosynthese in Verbindung gebracht wird. Außerdem besitzen Leydig-Zellen während ihrer Aktivitätsphase ein deutlich erkennbares ER, sowie zahlreiche Mitochondrien [Prince, 1984].

Die Spermatogenese wird maßgeblich durch die hormonelle Kontrolle über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse gesteuert. Der Hypothalamus schüttet das Gonadoliberin (*gonadotropin-releasing hormone*, GnRH) aus, welches die Freisetzung des follikelstimulierenden Hormons (*follicle*

stimulating hormone, FSH) und des luteinisierenden Hormons (*luteinizing hormone*, LH) aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL) bedingt. Die GnRH- Ausschüttung erfolgt dabei regelmäßig und pulsatil im Abstand von ca. 90 Minuten und beeinflusst die LH-Freisetzung in gleicher Weise. Die FSH-Freisetzung wird zusätzlich durch Inhibin und Aktivin beeinflusst und folgt deswegen nicht diesem regelmäßigen Schema. Die männlichen Keimzellen besitzen im Gegensatz zu den weiblichen Keimzellen keine Rezeptoren für FSH und so stimuliert FSH im männlichen Organismus die Spermatogenese indirekt durch eine Bindung an Sertoli-Zellen [Silverthorn, 2009]. Diese wirken durch die Synthese parakriner Moleküle aktivierend auf die Mitose der Spermatogonien. Außerdem wirkt FSH sowohl anregend auf die Synthese des Androgen-bindenden Proteins (*androgen binding protein*, ABP), als auch auf die Synthese von Inhibin [Silverthorn, 2009].

Die Leydig-Zellen spielen vielleicht die wichtigste Rolle für die endokrine Kontrolle der Spermatogenese. Durch die Anregung der Leydig-Zellen mit LH wird ihre Testosteron-Produktion stimuliert. Testosteron hemmt wiederum die Ausschüttung von LH im HVL, sowie die Synthese von GnRH im Hypothalamus. Die Anregung der LH-Rezeptoren an der äußeren Zellmembran bewirkt eine Aktivierung der Adenylatcyclase und damit einen Anstieg des intrazellulären cAMP [Saez, 1994]. Dieser Mechanismus ruft eine Rekrutierung von Cholesterin hervor, aus welchem dann in den Mitochondrien Pregnenolon gebildet wird [Miller, 2007]. Pregnenolon wird im ER dann weiter zu Testosteron umgebaut. Die Spermatozyten besitzen zwar keine Rezeptoren für Androgene wie Testosteron, exprimieren allerdings Rezeptoren für ABP. Die Sertoli-Zellen hingegen besitzen Androgen-Rezeptoren und sezernieren ABP. Deswegen wird davon ausgegangen, dass die Wirkung des Testosterons auch indirekt über die Sertoli-Zellen vermittelt wird [Silverthorn, 2009].

1.3.2. DER HODEN ALS EXOKRINES ORGAN, SERTOLI-ZELLEN UND SAMENKANÄLCHEN

Die Samenkanälchen, oder auch *tubuli seminiferi convoluti*, bilden in ihrer Summe den exokrinen Teil des Hodens. Sie beinhalten jeweils zwei verschiedene Arten von Zellen, die Keimzellen in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung, und die Sertoli-Zellen. Die Sertoli-Zellen gestalten das Gerüst der Samenkanälchen, indem sie radspeichenartig in das Lumen hineinragen und Ausläufer in lateraler und apikaler Richtung ausbilden. Zwischen den Sertoli-Zellen und ihren Ausläufern findet

die Spermatogenese statt. Hier entwickeln sich die Spermatogonien vom Spermatogonium bis zum Spermatozoon (Spermium). Die Sertoli-Zellen nehmen dabei direkten Einfluss auf die Keimzellen und regulieren ihre Entwicklung. So durchlaufen die Sertoli-Zellen, abhängig vom Zyklus des Keimepithels, morphologische und funktionelle Veränderungen und wirken außerdem über Rezeptoren für FSH, die auf oder innerhalb der Zelle lokalisiert sind, auf die Entwicklung der Keimzellen ein [Heckert und Griswold, 1993; Ye et al., 1993]. Darüber hinaus sind sie für die Versorgung und Regulierung der Spermienentwicklung zuständig, indem sie Proteine wie Inhibin und Aktivin, sowie Wachstumsfaktoren, Enzyme und ABP sezernieren. ABP bindet im Lumen des Samenkanälchens an Testosteron, wodurch dieses besser löslich wird. Durch die Proteinbindung des Testosterons wird auch eine Anreicherung im Lumen ermöglicht [Silverthorn, 2009]. Da Sertoli-Zellen im adulten Organismus nicht mehr mitotisch aktiv sind, bestimmt ihre Anzahl die Größe und die Produktionsleistung des Hodens [Clermont und Perey, 1957; Orth et al., 1988]. Die Spermatogenese findet von außen nach innen statt, sodass der Reifegrad der Spermatogonien entsprechend von außen nach innen hin zunimmt, bis die reifen Spermatozoen in das Lumen des Samenkanälchens entlassen werden und von dort ihren Weg durch den Nebenhoden beginnen. Um die *tubuli seminiferi* herum befindet sich eine Basallamina, die als Barriere dient und das jeweilige Kanälchen vor größeren Molekülen aus der interstitiellen Flüssigkeit abschirmt. In dieser Funktion trägt die Basallamina auch zur Bildung der sogenannten Blut-Hoden-Schranke (BHS) bei [Bergmann et al., 1989]. Die BHS unterteilt das Keimepithel in ein basales und ein adluminales Kompartiment. Hauptbestandteil dieser Blut-Hoden-Schranke bilden allerdings die Sertoli-Zellen, die durch *tight junctions* miteinander verbunden sind und so einen umfangreichen Schutz der Samenkanälchen gegen äußere Einflüsse gewährleisten. Neben ihrer Ammenfunktion und der Bildung der Blut-Hoden-Schranke, sind die Sertoli-Zellen während der Embryonalentwicklung durch die Sekretion des Anti-Müller-Hormons (AMH) an der Rückbildung der Müller-Gänge beteiligt.

Die Struktur der BHS wurde durch Bergmann et al. untersucht und im Menschen beschrieben [Bergmann et al., 1989]. Sie fungiert als Schutzschild der Keimzellen vor exogenen und endogenen Einflüssen aus der interstitiellen Flüssigkeit. In den letzten Jahren gab es mehr und mehr Interesse an Transportern, die Substanzen unter Umgehung der BHS in den Hoden hinein oder aus dem Hoden hinaus schleusen können. Eine solche Passage, welche durch die Sertoli-Zellen hindurch verlaufen muss, könnte z. B. durch MRP1, MRP4 oder das *breast cancer resistance protein* (BCRP) vermittelt werden [Robillard et al., 2012; Fietz et al., 2013].

1.3.2.1 SPERMATOGENESE UND KEIMZELLEN

Die Spermatogenese findet innerhalb der testikulären Samenkanälchen statt, die aus der peritubulären Lamina propria und dem Samenepithel bestehen. Letzteres besteht aus den Keimzellen und den somatischen Sertoli-Zellen. Die Urkeimzellen der Spermatogenese sind die Spermatogonien. Die spermatogenen Zellen werden von den Sertoli-Zellen und ihren Ausläufern eingefasst und machen im Zuge ihrer Entwicklung eine umfangreiche Vermehrung und Transformation durch: Zunächst durchlaufen sie mehrere mitotische Teilungen, was zu einer Anhäufung von Spermatogonien in der Nähe des basalen Endes der Sertoli-Zellen führt. Einige dieser neugebildeten Spermatogonien verbleiben an ihrer Position um in Zukunft weitere Spermatogonien zu bilden, während sich andere im ersten Schritt der Spermatogenese auf meiotischem Weg zu primären Spermatozyten entwickeln [Silverthorn, 2009]. Im weiteren Verlauf gehen aus diesen meiotisch erst die sekundären Spermatozyten und dann die haploiden Spermatiden hervor [Weyrauch et al., 2009]. Letztere vollführen in der Endphase der Spermatogenese eine Transformation zu Spermien. In dieser Phase findet auch die Golgi-, Kappen-, Akrosomen- und Reifungsphase statt, nach deren Durchlaufen die Spermien in das Lumen der Samenkanälchen entlassen werden. Erst während der Passage des intratestikulären, spermienableitenden Systems und des Nebenhodens erlangen die Spermien ihre Eigenmotilität und ihre Befruchtungsfähigkeit [Weyrauch et al., 2009].

1.3.2.2. STADIEN DER SPERMATOGENESE

Wie in Punkt 3.2. bereits beschrieben durchlaufen die Keimzellen im Zuge ihrer Entwicklung verschiedene Stadien. Diese Stadien werden in sechs verschiedene Phasen unterteilt [Heller und Clermont, 1963; Clermont, 1966]. Die Spermatogenese umfasst dabei die Proliferation der Spermatogonien, die Meiose der Spermatozyten und die Differenzierung von Spermatiden zu Spermatozoen. Diese sogenannten "Stadien der Spermatogenese" treten sequenziell entlang der Länge eines Samenkanälchens auf, wobei sich die Keimzellen mit zunehmender Ausreifung in Richtung des Lumens schieben [Bergmann, 2005]. Histologisch können die einzelnen Stadien wie folgt voneinander differenziert werden:

Stadium I:

- Zwei verschiedene Generationen von Spermatiden treten auf
- Runde und elongierte Spermatiden liegen scheinbar ungeordnet zusammen
- Auftreten von primären Spermatozyten im Pachytänstadium
- Vorkommen von Typ A und Typ B Spermatogonien
(Sowohl Typ A als auch Typ B sind mitotisch aktiv. Unterschieden werden Typ A Spermatogonien, die den Stammzellpool bilden und Typ B Spermatogonien, die zur Weiterentwicklung in die Meiose eintreten)

Stadium II:

- Einige Spermien sind kurz vor der Reifung
- Die Residualkörperchen-Abschnürung kann bei den Spermatiden beobachtet werden, sowie eine Vollendung der Spermiation
- Es treten pachytäne Spermatozyten auf
- Weiterhin Vorkommen von Typ A und Typ B Spermatogonien
- Entlassung der Spermien in das Lumen des Samenkanälchens

Stadium III:

- Nur noch eine Spermatidengeneration erkennbar
- Auftreten von pachytänen und präleptotenen Spermatozyten
- Vorkommen von Typ A Spermatogonien

Stadium IV:

- Beginn der Elongation runder Spermatiden
- Auftreten von präleptotenen und leptotenen Spermatozyten
- Vorkommen von Typ A Spermatogonien

Stadium V:

- Elongation der runden Spermatiden
- Auftreten von präleptotenen und leptotenen Spermatozyten
- Vorkommen von Typ A Spermatogonien
- Eintritt der Spermatozyten in die 1. Meiotische Reifeteilung

Stadium VI:

- Auftreten von sekundären Spermatozyten mit Übergang in die 2. Meiotische Reifeteilung
- Vorkommen runder Spermatiden

1.3.3. STÖRUNGEN DER SPERMATOGENESE

Die Störungen der hormonellen und genetischen Kontrollmechanismen der Spermatogenese, unabhängig von ihrer Ätiologie, können zu einer inkonsistenten Spermienproduktion, zur Bildung fehlerhafter oder nicht funktioneller Spermien und in schweren Fällen zu Azoospermie und Unfruchtbarkeit führen.

Man unterscheidet Störungen der hormonellen Regulationsmechanismen, Störungen der genetischen Regulationsmechanismen, Störungen der sequenziellen Expression von Kernproteinen in haploiden Spermatiden, Störungen der transkriptionellen Regulationsmechanismen und Störungen der translationalen Regulationsmechanismen [Steger, 2001].

Störungen der Spermatogenese können also verschiedene Ursachen haben, die auf jeder Ebene der Spermienentwicklung zu finden sind. Nur wenige führen dabei zu Unfruchtbarkeit.

Man spricht allgemein von einer Hypospermatogenese (hyp), wenn die Spermatogenese zwar qualitativ intakt ist, aber quantitativ reduziert ist. In diesem Fall werden noch intakte Spermien gebildet, weshalb es bei dieser Störung in der Regel nicht zur Ausbildung einer Infertilität kommt.

Die Spermatogenese kann allerdings auch auf verschiedenen Stufen sistieren. In diesem Fall spricht man von einem Arrest der Entwicklung. Dieser wird, je nach der Stufe des Entwicklungsstopps, benannt in Spermatidenarrest (sda), Spermatozytenarrest (sza) oder Spermatogonienarrest (sga). Wenn sich in den Samenkanälchen neben den Sertoli-Zellen keinerlei Entwicklungsstadien der Spermatogonien befinden, spricht man von einer Germinalzellaplasie, oder dem *sertoli cell only syndrome* (SCO). Dies wird noch gesteigert durch den sogenannten „Tubulusschatten“. In diesem Fall fehlen im Samenkanälchen sowohl jegliche Entwicklungsstadien der Spermatogonien, als auch die Sertoli-Zellen.

Bei zytologischen Untersuchungen der Samenflüssigkeit wird besonders häufig das OAT-Syndrom (Oligoasthenoteratozoospermie) diagnostiziert [Cooper et al. 2010]. In diesem Fall scheint der Serum-FSH-Spiegel eine Rolle zu spielen. Er korreliert negativ mit der Spermienzahl und positiv mit dem Schweregrad eines SCO [Bergmann et al., 1994; Martin-du-Pan und Bischof, 1995; Yaman et al., 1999; Steger, 2001]. Die OAT ist gekennzeichnet durch das Bild der „bunten Atrophie“, was bedeutet, dass in benachbarten Samenkanälchen gleichzeitig sowohl eine qualitativ normale Spermatogenese, ein Entwicklungsarrest auf verschiedenen Stufen, als auch das SCO auftreten können [Sigg, 1979; Steger, 2001].

Die Ausbildung einer generellen Unfruchtbarkeit setzt voraus, dass schwerwiegende Störungen in bestimmten, kritischen Phasen der Entwicklung auftreten. Diese kritischen Phasen umfassen vor allem die Differenzierung von Spermatogonien zu Spermatozyten, die Meiose innerhalb der Spermatozyten und die Metamorphose während der Spermiogenese [Toshimori et al., 2004]. Tritt beispielsweise eine Mutation in Form eines Polymorphismus in der Sequenz eines Gens auf, welches eine dieser Phasen substanziell beeinflusst, kann es von verschiedenen, milden Störungen der Spermatogenese bis hin zur Ausbildung einer manifestierten Infertilität kommen.

1.4. SODIUM-DEPENDENT ORGANIC ANION TRANSPORTER, SOAT/SOAT

Neben der *de novo* Steroidhormonsynthese in den Reproduktionsorganen bietet der Weg über die StS eine alternative Möglichkeit, biologisch aktive Steroidhormone in peripheren Organen zu bilden [Pasqualini et al., 1989; Labrie et al., 2003; Luu-The, 2013]. Um dies zu ermöglichen werden jedoch Aufnahmetransporter benötigt, welche Steroidsulfate aus der Blutzirkulation in eine Zielzelle

aufnehmen können. Darüber hinaus kann ein Zusammenspiel von Aufnahme- und Effluxtransportern für Steroidsulfate die Überwindung von Blut-Gewebe-Schranken wie der BHS ermöglichen [Hartmann et al., 2016].

Neben den bereits bekannten Aufnahmetransportern für sulfokonjugierte Steroidhormone wurde im Jahr 2004 der *sodium-dependent organic anion transporter* SOAT/Soat identifiziert [Geyer et al., 2004]. SOAT/Soat hebt sich dabei durch seine hohe Substratspezifität für Steroid-Sulfate von den anderen bereits beschriebenen Transportern ab. Während OATPs, OATs und MRPs multispezifisch eine Vielzahl von unterschiedlichen Substraten erkennen und transportieren, scheint SOAT/Soat auf den Transport sulfokonjugierter Steroidhormone spezialisiert zu sein. Eine weitere Besonderheit von SOAT/Soat ist die strikte Natrium-Abhängigkeit des Transportes. Interessant werden diese Charakteristika allerdings erst, wenn man sich das Expressionsprofil von SOAT/Soat ansieht: Im Menschen wird SOAT prädominant im Hoden exprimiert und wurde unter anderem auch in Haut, Pankreas und Brustdrüse nachgewiesen. In der Maus zeigt Soat die höchste Expression in Lunge, Haut und Hoden. In beiden Spezies wurde das Protein mittels Immunhistochemie (IHC) vor allem in Spermatozyten und Spermatischen detektiert, was vermuten lässt, dass SOAT/Soat im Hoden von Mensch und Maus ähnliche Funktionen wahrnimmt [Geyer et al., 2007; Fietz et al., 2013; Grosser et al., 2013]. Darüber hinaus konnten Fietz et al. eine verminderte Expression von SOAT bei verschiedenen Störungen der Spermatogenese nachweisen [Fietz et al., 2013].

Durch das auffällige Expressionsprofil von SOAT/Soat sowie seine hohe Spezifität für sulfokonjugierte Steroidhormone könnte dieser Transporter eine besondere Rolle für die lokale Versorgung mit Steroiden im Hoden und somit für die männliche Fruchtbarkeit spielen.

Basierend auf dieser Hypothese sollte in der vorliegenden Arbeit ein Zusammenhang zwischen SOAT-vermitteltem Transport sulfokonjugierter Steroide und einer Störung der Spermatogenese untersucht werden. Hierfür wurden zwei Situationen betrachtet, in denen von einem defizienten SOAT-Transport ausgegangen werden muss. Hierbei handelte es sich zum einen um funktionsbeeinträchtigende, natürlich vorkommende genetische Varianten beim Menschen und zum anderen um eine gezielte Mutation des *Slc10a6*-Gens in einer *Slc10a6*-Knockout-Maus. In beiden Situationen sollte untersucht werden, ob der Funktionsverlust von SOAT/Soat zu einer Störung der Spermatogenese und einer möglichen anschließenden Unfruchtbarkeit führt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in der folgenden Diskussion vorgestellt und diskutiert.

2. ÜBERSICHT DER PUBLIKATIONEN MIT DARSTELLUNG DES EIGENANTEILS

Der vorliegenden Dissertationsschrift liegen die folgenden drei Publikationen zu Grunde (Volltext siehe Anhang).

2.1. PUBLIKATION #1

Grosser, G., Bennien, J., Sánchez-Guijo, A., Bakhaus, K., Döring, B., Hartmann, M., Wudy, S.A., Geyer, J. (2018):

„Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*)“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 20-25

[doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.013](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.013)

(Authors in bold equally contributed)

Abstract:

The sodium-dependent organic anion transporter SOAT/Soat shows highly specific transport activity for sulfated steroids. SOAT substrates identified so far include dehydroepiandrosterone sulfate, 16 α -hydroxydehydroepiandrosterone sulfate, estrone-3-sulfate, pregnenolone sulfate, 17 β -estradiol-3-sulfate, and androstenediol sulfate. Apart from these compounds, many other sulfated steroids occur in mammals. Therefore, we aimed to expand the substrate spectrum of SOAT and analyzed the SOAT-mediated transport of eight different sulfated steroids by combining in vitro transport experiments in SOAT-transfected HEK293 cells with LC-MS/MS analytics of cell lysates. In addition, we aimed to better understand the structural requirements for SOAT substrates and so selected structural pairs varying only at specific positions: 3 α /3 β -sulfate, 17 α /17 β - sulfate, mono-sulfate/di-sulfate, and 17 α -hydroxylation. We found significant and sodium-dependent SOAT mediated transport of 17 α -hydroxypregnenolone sulfate, 17 β -estradiol-17-sulfate, androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, testosterone sulfate, epitestosterone sulfate, and 5 α -dihydrotestosterone sulfate. However, 17 β -estradiol-3,17-disulfate was not transported by SOAT. In conclusion: SOAT substrates from the group of sulfated steroids are characterized by a planar and lipophilic steroid backbone in trans-trans-trans conformation of the rings and a negatively charged mono-sulfate group at positions 3' or 17' with flexibility for α - or β - orientation. Furthermore, 5 α -reduction, 16 α -hydroxylation, and 17 α -hydroxylation are acceptable for SOAT substrate recognition, whereas addition of a second negatively charged sulfate group seems to abolish substrate binding to SOAT, and so 17 β -estradiol-3,17-disulfate is not transported by SOAT.

2.1.1 EIGENANTEIL PUBLIKATION #1

Publication 1:

Grosser, G., Bennien, J., Sánchez-Guijo, A., Bakhaus, K., Döring, B., Hartmann, M., Wudy, S.A., Geyer, J. (2017):

„Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6)“

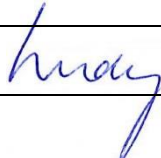
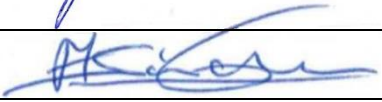

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, in press, corrected proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.013>

Authors in bold equally contributed.

In this publication, I was involved in study design and selection of the analytes. Furthermore, the transport studies were performed by me, including cell culture, substance preparation, handling of the samples, conducting the experiment and protein measurement. The following LC/MS-MS analysis took place in the laboratory of Prof. Wudy. Dr. Sánchez-Guijo subsequently provided me the raw data, which I processed statistically and graphically. Moreover, I was involved in the composition of the manuscript, particularly in the material and methods part, the results part, and the discussion.

I hereby confirm that I fully agree with the presentation of the contribution of Josefine Bennien to the publication given above:

Prof. Dr. Joachim Geyer	
Prof. Dr. Stefan A. Wudy	
Dr. Gary Grosser	
Dr. Alberto Sánchez-Guijo	
Dr. Katharina Bakhaus	
Dr. Barbara Döring	
Dr. Michaela Hartmann	

Publication 1 (Fortsetzung):

Grosser, G., Bennien, J., Sánchez-Guijo, A., Bakhaus, K., Döring, B., Hartmann, M., Wudy, S.A., Geyer, J. (2017):

„Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6)“


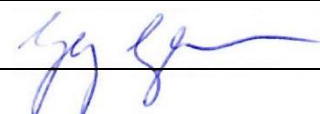

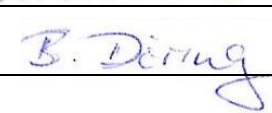
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, in press, corrected proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.013>

Authors in bold equally contributed.

In this publication, I was involved in study design and selection of the analytes. Furthermore, the transport studies were performed by me, including cell culture, substance preparation, handling of the samples, conducting the experiment and protein measurement. The following LC/MS-MS analysis took place in the laboratory of Prof. Wudy. Dr. Sánchez-Guijo subsequently provided me the raw data, which I processed statistically and graphically. Moreover, I was involved in the composition of the manuscript, particularly in the material and methods part, the results part, and the discussion.

I hereby confirm that I fully agree with the presentation of the contribution of Josefine Bennien to the publication given above:

Prof. Dr. Joachim Geyer	
Prof. Dr. Stefan A. Wudy	
Dr. Gary Grosser	
Dr. Alberto Sánchez-Guijo	
Dr. Katharina Bakhaus	
Dr. Barbara Döring	
Dr. Michaela Hartmann	

2.2. PUBLIKATION #2

Bennien, J., Fischer, T., Geyer, J. (2018):

„Rare genetic variants in the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*): Effects on transport function and membrane expression“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 26-35

doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.004

Abstract:

Sulfo-conjugated steroid hormones, such as dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), pregnenolone sulfate or estrone-3-sulfate are abundant in the body, but are biologically inactive at classical androgen and estrogen steroid receptors. However, after carrier-mediated import and de-conjugation by the steroid sulfatase, these compounds participate in the overall steroid regulation of reproductive organs. The sodium-dependent organic anion transporter SOAT, coded by the *SLC10A6* gene, is specific for the transport of steroid sulfates and is highly expressed in testicular germ cells, including pachytene spermatocytes, secondary spermatocytes, and round spermatids. Therefore, SOAT is supposed to be involved in the regulation of spermatogenesis and male fertility. In the present study, the *SLC10A6* gene was analyzed for rare genetic variants, which might affect transport function or membrane expression of SOAT. Among the 31 SOAT variants analyzed, L44P, Q75R, P107L, G109S, S112F, N113K, S133F, G241D, G263E, G294R, and Y308N showed no transport activity for DHEAS at all. In the case of P107L, G241D, G263E, and Y308N, this was most likely due to significantly reduced expression in the plasma membrane. Other variants are located directly at (Q75R, S112F, N113K) or close to (G109S, S133F, and G263E) the supposed SOAT Na⁺ binding sites and thus could disable the sodium-coupled transport cycle. If these loss-of-function SOAT variants are more frequent in men with impaired spermatogenesis or infertility needs further investigation.

2.2.1 EIGENANTEIL PUBLIKATION #2

Publication 2:

Bennien, J., Fischer, T., Geyer, J. (2017):

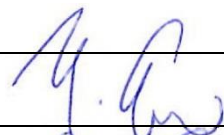

„Rare genetic variants in the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6): Effects on transport function and membrane expression“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, in press, corrected proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.004>

In this publication, I was involved in the experimental design. In addition, I planned and conducted all mutations of the constructs, including primer design, generation of the PCR protocol, performing of the PCR and evaluation and amplification of the constructs. Furthermore, I carried out the transport experiments with radiolabeled compounds. These included cell culture, transfection of the mutant constructs into the cells, preparation of the samples, and performance of the experiments, protein measurement and liquid scintillation counting. The evaluation, statistical and graphical processing of the data was performed by Dr. Fischer and me. 3D homology modelling of SOAT was carried out by me. Moreover, I was involved in the preparation of the draft manuscript, particularly regarding the material and methods part, the results part and the discussion.

I hereby confirm that I fully agree with the presentation of the contribution of Josefine Bennien to the publication given above:

Prof. Dr. Joachim Geyer	
Dr. Thomas Fischer	

2.3. PUBLIKATION #3

Bakhaus, K., Bennien, J., Fietz, D., Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M., Serafini, R., Love, C.C., Golovko, A., Wudy, S.A., Bergmann, M., Geyer, J. (2018):

„Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 45-54

doi: [10.1016/j.jsbmb.2017.07.019](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019)

(Authors in bold equally contributed)

Abstract:

The sodium-dependent organic anion transporter SOAT (gene name *SLC10A6* in man and *Slc10a6* in mice) is a plasma membrane transporter for sulfated steroids, which is highly expressed in germ cells of the testis. SOAT can transport biologically inactive sulfated steroids into specific target cells, where they can be reactivated by the steroid sulfatase (StS) to biologically active, unconjugated steroids known to regulate spermatogenesis. Significantly reduced SOAT mRNA expression was previously found in different forms of impaired spermatogenesis in man. It was supposed that SOAT plays a role for the local supply of steroids in the testis and consequently for spermatogenesis and fertility. Thus, an *Slc10a6*^{-/-} Soat knockout mouse model was established by recombination-based target deletion of the *Slc10a6* gene to elucidate the role of Soat in reproduction. However, the *Slc10a6*^{-/-} knockout mice were fertile, produced normal litter sizes, and had normal spermatogenesis and sperm vitality. This phenotype suggests that the loss of Soat can be compensated in the knockout mice or that Soat function is not essential for reproduction. In addition to reproductive phenotyping, a comprehensive targeted steroid analysis including a set of 9 unconjugated and 12 sulfo-conjugated steroids was performed in serum of *Slc10a6*^{-/-} knockout and *Slc10a6*^{+/+} wildtype mice. Only cholesterol sulfate, corticosterone, and testosterone (only in the males) could be detected in considerable amounts. Interestingly, male *Slc10a6*^{-/-} knockout mice showed significantly higher serum levels for cholesterol sulfate compared to their wildtype controls. As cholesterol sulfate has a broader impact apart from the testis, further analysis of this phenotype will include other organs such as skin and lung, which also show high Soat expression in the mouse.

2.3.1 EIGENANTEIL PUBLIKATION #3

Publication 3:

Bakhaus, K., Bennien, J., Fietz, D., Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M., Serafini, R., Love, C.C., Golovko, A., Wudy, S.A., Bergmann, M., Geyer, J. (2017):

„Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate“



Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, in press, corrected proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019>

Authors in bold equally contributed.

In this publication, I contributed to the experimental design and the development of the study course. I conducted the dissection of the mice, as well as the preparation and processing of the organ samples. The process of immunohistochemistry was performed by Dr. Bakhaus and me; I carried out the microscopic analysis of the immunostained organ-slides and generated the fluorescent pictures. Furthermore, I was involved in RNA and cDNA preparation. The raw data regarding the reproductive behavior of the mice was evaluated and processed graphically and statistically by Dr. Bakhaus and me. The LC/MS-MS analysis took place in the laboratory of Prof. Wudy. Dr. Sánchez-Guijo subsequently provided the raw data, which I processed statistically and graphically. CASA-analysis was performed at the College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences. The raw data regarding the sperm analysis was provided by Dr. Golovko. Evaluation, as well as graphical and statistical processing of the CASA data was performed by me. In addition, I was involved in the preparation of the manuscript.

I hereby confirm that I fully agree with the presentation of the contribution of Josefine Bennien to the publication given above:

Prof. Dr. Joachim Geyer	
Prof. Dr. Martin Bergmann	
Prof. Dr. Stefan A. Wudy	
Dr. Katharina Bakhaus	
Dr. Daniela Fietz	
Dr. Michaela Hartmann	

Publication 3 (Fortsetzung):

Bakhaus, K., Bennien, J., Fietz, D., Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M., Serafini, R., Love, C.C., Golovko, A., Wudy, S.A., Bergmann, M., Geyer, J. (2017):

„Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate“

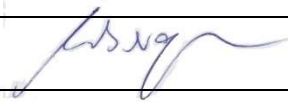
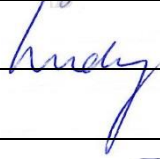

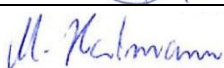

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, in press, corrected proof.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019>


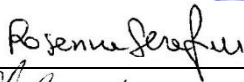

Authors in bold equally contributed.

In this publication, I contributed to the experimental design and the development of the study course. I conducted the dissection of the mice, as well as the preparation and processing of the organ samples. The process of immunohistochemistry was performed by Dr. Bakhaus and me; I carried out the microscopic analysis of the immunostained organ-slides and generated the fluorescent pictures. Furthermore, I was involved in RNA and cDNA preparation. The raw data regarding the reproductive behavior of the mice was evaluated and processed graphically and statistically by Dr. Bakhaus and me. The LC/MS-MS analysis took place in the laboratory of Prof. Wudy. Dr. Sánchez-Guijo subsequently provided the raw data, which I processed statistically and graphically. CASA-analysis was performed at the College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences. The raw data regarding the sperm analysis was provided by Dr. Golovko. Evaluation, as well as graphical and statistical processing of the CASA data was performed by me. In addition, I was involved in the preparation of the manuscript.

I hereby confirm that I fully agree with the presentation of the contribution of Josefine Bennien to the publication given above:

Prof. Dr. Joachim Geyer	
Prof. Dr. Martin Bergmann	
Prof. Dr. Stefan A. Wudy	
Dr. Katharina Bakhaus	
Dr. Daniela Fietz	
Dr. Michaela Hartmann	
Dr. Alberto Sánchez-Guijo	

Publication 3 (Fortsetzung):

Andrei E. Golovko, PhD, MBA	
Rosanna Serafini DVM, PhD	
Charles C. Love DVM, PhD	

3. DISKUSSION

3.1. *SLC10A6/SLC10A6*-GEN UND *SOAT/SOAT*-PROTEIN

Der *sodium-dependent organic anion transporter* (SOAT als Abkürzung für das menschliche Protein, Soat entsprechend für die tierischen Homologe) wurde das erste Mal im Jahr 2004 aus Nebennierengewebe einer Ratte kloniert und charakterisiert [Geyer *et al.*, 2004].

Im Jahr 2007 wurde auch das menschliche SOAT-Gen beschrieben [Geyer *et al.*, 2007]. Das *SLC10A6*-Gen besitzt eine Gesamtlänge von 25,8 kb. Es befindet sich auf Chromosom 4 und wird durch sechs Exone kodiert, die in der Region 4q21.3 kartiert sind. Seine Zugehörigkeit zur *SLC10*-Transporter-Familie, die auch als *sodium/bile acid cotransporter family* bekannt ist, basiert auf seiner hohen Aminosäuresequenzhomologie zum *apical sodium-dependent bile acid transporter* (ASBT) (41,8% Sequenzidentität, 69,7% Sequenzähnlichkeit) und zum *sodium/taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) (33,4% Sequenzidentität, 62,6% Sequenzähnlichkeit) [Geyer *et al.*, 2007]. NTCP, ASBT und SOAT haben einige gemeinsame Sequenzmotive, von welchen das Motiv „ALGMMPL“ als Signaturmotiv der *SLC10*-Familie beschrieben wurde [Geyer *et al.*, 2006]. Das SOAT-Transkript umfasst insgesamt 1502 Basenpaare (bp) und beinhaltet einen offenen Leserahmen von 1134 bp. Das SOAT-Protein besteht aus 377 Aminosäuren und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 41,2 kDa. Das scheinbare Molekulargewicht der glycosylierten Form liegt im Western Blot bei 46 kDa, nach PNGase F-Behandlung liegt das scheinbare Molekulargewicht der unglycolisierten Form bei 42 kDa.

Die Membrantopologie wurde mit Hilfe von bioinformatischen Berechnungen auf 7-9 Transmembrandomänen bestimmt. Experimentell konnte für den N-Terminus des Proteins eine extrazelluläre und für den C-Terminus eine intrazelluläre Lokalisation festgestellt werden [Döring, 2009], was eine Struktur mit 8 Transmembrandomänen ausschließt. Basierend auf zwei jüngeren Kristallstrukturen von bakteriellen homologen zu NTCP, ASBT und SOAT, spricht einiges für eine 9 Transmembrandomänen Struktur von SOAT [Hu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014; Döring *et al.*, 2012].

3.2. TRANSPORTFUNKTION

Im Laufe des Charakterisierungsprozesses von SOAT/Soat wurde die physiologische Transportfunktion des Proteins in verschiedenen Expressionsmodellen untersucht. Obwohl SOAT/Soat phylogenetisch in die *sodium/bile acid cotransporter family* gehört, zeigt das Protein keinerlei Transportaktivität für Gallensäuren.

In verschiedenen Experimenten konnte allerdings eine Transportaktivität für E₁S, DHEAS und PregS nachgewiesen werden, welche infolgedessen grundlegend für seine Charakterisierung als spezifischer Steroid-Sulfat Aufnahme-Transporter waren [Geyer et al., 2004; Geyer et al., 2007; Grosser et al., 2013; Geyer et al., 2017].

Zunächst wurde getestet, ob das Homolog der Ratte (rSoat) als Transporter für Steroid-Substrate fungiert. Hierzu wurde die Aufnahmen von E₁S, DHEAS, Taurocholat (TC), Estradiol-17 β -Glucuronid und Ouabain im *xenopus laevis*-Expressionssystem gemessen [Geyer et al., 2004]. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass rSoat in *x. laevis* Oozyten zwar Transportaktivität für E₁S und DHEAS besitzt, jedoch nicht für TC, Estradiol-17 β -Glucuronid und Ouabain. Im weiteren Verlauf der Experimente in *x. laevis* Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Ersatz von NaCl durch äquimolare Konzentrationen von Cholinchlorid im Transportpuffer die E₁S-Aufnahme aufhebt. Auf diese Weise konnte eine Abhängigkeit des rSoat-Transports vom elektrochemischen Natrium-Gradienten bewiesen werden. Darüber hinaus wurde auch die Kinetik der rSoat-vermittelten E₁S- und DHEAS-Aufnahme, unter Verwendung zunehmender Substratkonzentrationen, in diesem System gemessen [Geyer et al., 2004].

Im Jahr 2007 wurde die funktionelle Charakterisierung des menschlichen SOAT Proteins in stabil transfizierten SOAT-HEK293-Zellen unter Verwendung des Flp-In-T-REx-Expressionssystem durchgeführt [Geyer et al., 2007]. In diesem System steht die SOAT-Expression unter der Kontrolle des Tetracyclin-regulierten Cytomegalovirus/tetO₂-Hybrid-Promotors. Deswegen wurde die Expression durch eine Vorbehandlung mit Tetracyclin induziert. Die Transportexperimente wurden mit mehreren radioaktiv markierten Steroidverbindungen durchgeführt. Eine SOAT-spezifische Transportaktivität konnte im Zellsystem nicht für unkonjugierte Steroide (Estron und Dehydroepiandrosteron), glucuronidierte Steroide (Estradiol-17 β -D-Glucuronid und Estron-3 β -D-Glucuronid), Gallensäuren (Taurocholsäure, Cholsäure, Chenodesoxycholsäure, Desoxycholsäure und Lithocholsäure) oder Herzglykoside (Ouabain und Digoxin) nachgewiesen werden. Ein

spezifischer Transport wurde jedoch für DHEAS, E₁S und PREGS beobachtet. Außerdem wurden im Zellsystem auch eine Charakterisierung des SOAT-Transports hinsichtlich Zeitabhängigkeit, Natrium-Abhängigkeit und Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt.

Klonierung, Expressionsanalyse und funktionelle Charakterisierung des Maus-Soat (mSoat) wurde im Jahr 2013 durchgeführt und seine Eigenschaften mit dem menschlichen SOAT-Protein verglichen [Grosser *et al.*, 2013]. Auch hier wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet, diesmal transfiziert mit dem mSoat Protein. Auch für mSoat konnte ein Natrium-abhängiger Transport für DHEAS, E₁S und PREGS gezeigt werden. Im Gegensatz zu menschlichem SOAT, der DHEAS als Substrat bevorzugt, wies mSoat die höchste Transportrate für PREGS auf, was vermutlich Unterschiede in Steroidmuster und metabolischen Steroidwegen der beiden Spezies widerspiegelt [Conley und Bird, 1997; Fluck *et al.*, 2003; Maninger *et al.*, 2009; Grosser *et al.*, 2013]. Möglicherweise liegt dieser Unterschied im K_m-Wert für DHEAS zwischen SOAT und mSoat darin begründet, dass Ratten und Mäuse in der Peripherie niedrigere Konzentrationen von DHEAS aufweisen als Menschen, bei denen DHEAS das am häufigsten vorkommende Steroid im Kreislauf ist [Cutler *et al.*, 1978; Longcope, 1996; Maninger *et al.*, 2009; Grosser *et al.*, 2013]. Im menschlichen Organismus wird DHEAS sowohl in den Nebennieren, als auch in den Gonaden gebildet, während die Produktion im Organismus von Ratten und Mäusen auf die Gonaden beschränkt ist [Perkins und Payne, 1988; Longcope, 1996; Maninger *et al.*, 2009; Grosser *et al.*, 2013].

Obwohl gewisse Unterschiede zwischen dem menschlichen SOAT-Protein und mSoat existieren, konnten beide Proteine als homologe Transporter eingeordnet werden [Grosser *et al.*, 2013].

Klassischerweise werden Transportexperimente *in vitro* über eine Markierung der zu testenden Substanz mit einem radioaktiven Anhang, z. B. Tritium [³H], über Flüssigszintillationsmessung durchgeführt (*liquid scintillation counting*, LSC). Ein Problem bei der Nutzung von radioaktiv markierten Substanzen ist deren begrenzte kommerzielle Verfügbarkeit. Außerdem besteht bei dieser Methode die Möglichkeit, dass durch Hydrolyse dekonjugierte, oder anderweitig modifizierte Steroide fälschlicherweise mit analysiert werden, da bei dieser Methode nicht direkt das intakte Steroidmolekül, sondern nur die Radioaktivität im Flüssigszintillationscounter nachgewiesen wird [Geyer *et al.*, 2006; Roth *et al.*, 2012]. Aufgrund dieser Limitationen wurden auch Transportexperimenten ohne radioaktive Markierung der Substanzen mit Hilfe der Massenspektrometrie, mit vorgeschalteter Flüssigchromatografie (LC-MS/MS) durchgeführt. Diese Analysen erfolgten im Labor von Prof. Dr. Wudy (Abteilung für pädiatrische Endokrinologie und

Diabetologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen). Diese Methode repräsentiert den Goldstandard für die Steroidanalytik und ermöglicht es hochspezifisch verschiedenste intakte und sulfokonjugierte Steroide in einem LC-MS/MS Lauf zu detektieren und zu quantifizieren [Galuska et al., 2013; Sanchez-Guijo et al., 2015a]. Mittels dieser Technik konnte die Funktionsweise von SOAT/Soat genauer unter die Lupe genommen werden [Fietz et al., 2013]. Zudem wurden Estradiol-3-Sulfat (E_2 -3S) und Androstendiol-Sulfat als neue SOAT-Substrate identifiziert.

Auf Grundlage dieser Vorarbeiten sollte das Substratspektrum von SOAT mit Hilfe der LC-MS/MS systematisch untersucht und erweitert werden (**siehe Publikation #1**).

Die verschiedenen sulfokonjugierten Steroide sehen sich strukturell sehr ähnlich. Den Grundaufbau bildet bei allen Vertretern das Steroidgerüst, bestehend aus drei Cyclohexanringen und einem Cyclopentanring. Angelagert an dieses Gerüst befinden sich eine oder mehrere Sulfatgruppen (SO_4^{2-}). Moleküle nehmen ohne Energiezufuhr immer eine energetisch möglichst günstige Konformation ein. Wenn dies energetisch nicht von Bedeutung ist, können Seitengruppen auch in unterschiedlichen Konformationen vorkommen, so z. B. die SO_4^{2-} -Gruppe der Steroid-Sulfate in α - oder β -Konformation.

Um definieren zu können, welche Modifikationen oder Konformationsänderungen im Steroid-Sulfatmolekül von SOAT für den Transport noch toleriert werden, wurden bedeutende Strukturunterschiede, die bei sulfokonjugierten Steroiden auftreten, näher untersucht. Der Fokus lag dabei auf der Anzahl und der Lokalisation der Sulfatgruppen an den Positionen C3 und/oder C17 (17 β -Estradiol-3-Sulfat (E_2 -3S) vs. 17 β -Estradiol-17-Sulfat (E_2 -17S) vs. Estradiol-Disulfat (E_2 -diS)), sowie deren Orientierung in C3 α , C3 β , C17 α oder C17 β Konformation (Androsteron-Sulfat (AnS), Epiandrosteron-Sulfat (epiAnS), Epitestosteron-Sulfat (eTS), Testosteron-Sulfat (TS)). Außerdem wurden mit 17 α -Hydroxy-Pregnenolon-Sulfat (17 α -OH-PregS) und 5 α -Dihydrotestosteron-Sulfat (DHTS) noch weitere mögliche Modifikationen untersucht.

Die verschiedenen sulfokonjugierten Steroide wurden in Zelltransport-Experimenten mit SOAT-HEK293 Zellen inkubiert. Über LC-MS/MS wurden die jeweiligen Steroide aus dem Zelllysat quantifiziert und so ermittelt, ob die Testsubstanz von SOAT transportiert wird.

Erste Hinweise darauf, dass neben den bereits bekannten SOAT-Substraten noch weitere Steroid-Sulfate von SOAT transportiert werden, wurden zunächst mit Hilfe von Inhibitionsexperimenten ermittelt. E₂-17S und E₂-diS konnten dabei den [³H]DHEAS-Transport konzentrationsabhängig hemmen. E₂-17S stellte sich dabei in seiner Hemmwirkung sogar als potenter heraus als E₂-3S. Als Vergleich zeigte Estrone-3-Glucuronid, welches nicht von SOAT transportiert wird [Geyer *et al.*, 2007], nur eine geringe Inhibition des [³H]DHEAS Transports, sogar bei 100-fach höherer Konzentration als das Transportsubstrat.

Aus diesem Grund wurde angenommen, dass neben den bekannten an 'C3-sulfokonjugierten Steroiden auch an 'C17-sulfokonjugierte Steroide von SOAT transportiert werden könnten. Darüber hinaus wurde vermutet, dass auch das an den Positionen 'C3 und 'C17 doppelt sulfokonjugierte E₂-diS ein Substrat von SOAT sein könnte.

SOAT zeigt bekanntermaßen einen signifikanten Natrium-abhängigen Transport von PregS [Geyer *et al.*, 2017; Grosser *et al.*, 2013]. Darüber hinaus konnte mit der kombinierten Methode aus Zelltransport und LC-MS/MS nun auch 17 α -OH-PregS als neues SOAT-Substrat identifiziert werden (**Publikation #1**). Im Vergleich zu PregS scheint hier allerdings die zusätzliche, polare OH-Gruppe an Position C17 sowohl die SOAT-Transportrate als auch die unspezifische, transportunabhängige Aufnahme von 17 α -OH-PregS in die SOAT-HEK293-Zellen und in die entsprechenden Kontrollzellen zu beeinträchtigen. Daher spielt die Polarität des Substrats vermutlich eine Rolle für den SOAT-vermittelten Transport (**Publikation #1**).

Pregnenolon (Preg) und seine Derivate PregS und 17-OH-PregS werden als wirksame Neurosteroiden angesehen und kommen im ZNS in unterschiedlichen Konzentrationen vor. Im Gehirn verschiedener Mausstämme konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass PregS im Vergleich zu Preg in relativ hohen Konzentrationen vorkommt und 17-OH-PregS, verglichen mit seiner unkonjugierten Form, prädominant vorkommt [Tagawa *et al.*, 2006]. Neurosteroiden gelten als Modulatoren von Neurotransmitter-Rezeptoren und haben daher einen Einfluss auf viele ZNS-Funktionen [Schumacher *et al.*, 1997; Flood und Roberts, 1988; Flood *et al.*, 1988; Baulieu, 1997; Farr *et al.*, 2004].

Aus der Gruppe der Östrogene wurde der Transport von E₂-3S, E₂-17S und E₂-diS über SOAT untersucht, wobei E₂-3S bereits als SOAT-Substrat bekannt war [Fietz *et al.*, 2013] Es konnte gezeigt werden, dass E₂-3S und E₂-17S Natrium-abhängig von SOAT transportiert werden. Im Gegensatz dazu konnte E₂-diS, obwohl es im Zelllysate nachweisbar war, nicht quantifiziert werden. Dies ist

höchstwahrscheinlich auf die sehr hohe Polarität und die doppelt negative Ladung des Moleküls zurückzuführen. Damit ist auch die Membranpermeabilität von E₂-diS erwartungsgemäß gering. Aus diesen Gründen wird angenommen, dass E₂-diS kein Substrat von SOAT ist (**Publikation #1**).

Dass sowohl E₂-3S, als auch E₂-17S von SOAT transportiert werden, erscheint zunächst unplausibel. Die Erklärung hierfür ist allerdings in der hohen strukturellen Ähnlichkeit der beiden Moleküle zu finden. Sulfokonjugierte Steroide sind pseudosymmetrisch, was bedeutet, dass es strukturell gesehen gleichgültig ist, auf welcher Seite des Moleküls die SO₄²⁻-Gruppe angehängt ist. Sowohl bei E₂-3S, als auch bei E₂-17S liegt das Steroidgrundgerüst in *trans-trans-trans*-Konformation vor. Hinzu kommen jeweils eine SO₄²⁻-Gruppe an einem und eine OH-Gruppe am anderen Ende des Moleküls. Dieser Aufbau bewirkt, dass die beiden Moleküle eine sehr hohe strukturelle Überlappung aufweisen, wenn eins der beiden um 180° in der Ebene gedreht wird. So lässt sich auch erklären warum der Transport mit einer weiteren, am gegenüberliegenden Ende lokalisierten SO₄²⁻-Gruppe nicht mehr funktioniert. Die zusätzliche Raumforderung, die durch die zweite SO₄²⁻-Gruppe im E₂-diS entsteht, könnte die Bindung des Moleküls in der Substrat-Bindungstasche von SOAT sterisch behindern. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die zusätzliche negative Ladung eine Bindung bzw. einen Transport über SOAT unmöglich macht.

Die pathophysiologische Bedeutung von E₂-3S, besonders für die Proliferation des hormonabhängigen Mammakarzinoms, ist gut bekannt [*Pasqualini und Chetrite, 2012*]. E₂-3S wird durch Transporter vermittelte Prozesse in die Tumorzellen aufgenommen und die Sulfat-Gruppe durch die StS abgespalten [*Müller et al., 2015*]. Das nun biologisch aktive Estradiol aktiviert daraufhin die nukleären Östrogenrezeptoren und trägt so zur Proliferation der malignen Zellen bei. Basierend auf diesem Mechanismus sind neben Östrogenrezeptor-Antagonisten auch StS-Inhibitoren für die Brustkrebstherapie wirksam [*Day et al., 2009*]. Im Gegensatz dazu ist über die Rolle und das quantitative Vorkommen von E₂-17S und E₂-diS in Blut und Urin bis heute noch nicht viel bekannt [*Zhang und Henion, 1999*]. Sowohl der Serum- als auch der Urinspiegel von E₂-17S nehmen im Verlauf einer Schwangerschaft zu [*Yoshizawa et al., 1992*].

Da die genaue Position der Sulfokonjugation am Steroidmolekül also nicht ausschlaggebend für den Transport zu sein scheint, bleibt die Frage, welche Konformation die SO₄²⁻-Gruppe an den Positionen 'C3 oder C17 des Steroidmoleküls einnehmen kann, damit das Steroid-Sulfat als Substrat von SOAT

erkannt wird. Interessanterweise konnte für alle in diese Richtung untersuchten Substanzen ein signifikanter, Natrium-abhängiger Transport über SOAT nachwiesen werden. Die Substraterkennung von SOAT scheint also an der Sulfat-Position flexibel zu sein und akzeptiert eine Konformation der SO_4^{2-} -Gruppe in 3α - (AnS) oder 3β - (epiAnS) sowie 17α - (epiTS) oder 17β -Position (TS). Außerdem konnte gezeigt werden, dass neben E_2 -17S noch weitere, C17 einfach sulfokonjugierte Steroide von SOAT transportiert werden: TS und epiTS (**Publikation #1**).

Als weitere Testsubstanz wurde DHTS verwendet, das auf Grund der 5α -Reduktion eine etwas andere Konformation des A-Rings im Vergleich zu TS aufweist, aber genau wie TS an eine C17 eine SO_4^{2-} -Gruppe in β -Konformation besitzt. Auch für DHTS wurde ein signifikanter Transport gezeigt und damit ergänzt DHTS die Liste der SOAT Substrate.

Sulfokonjugierte Steroidhormone wurden ursprünglich als metabolische Abfallprodukte betrachtet. In den letzten Jahren hat sich allerdings herausgestellt, dass sie ein im Organismus zirkulierendes Reservoir für biologisch aktive Steroidhormone darstellen [Selcer et al., 2002; Pasqualini, 2005; Pasqualini und Chetrite, 2005; Geyer et al., 2017].

Dank ihrer längeren Halbwertszeit können sulfokonjugierte Steroide im Kreislauf länger persistieren als ihre nicht konjugierten Formen. Ihre Hydrolyse durch die StS findet größtenteils in hormonabhängigen Geweben wie der Brustdrüse, den Ovarien, dem Hoden, der Plazenta (speziesabhängig) und dem Uterus statt [Hobkirk, 1993; Reed et al., 2005; Müller et al., 2015; Geyer et al., 2017].

Bemerkenswert ist, dass die plazentare StS-Expression während der Schwangerschaft wesentlich höher ist als die StS-Expression in anderen Geweben und dass auch die Blutspiegel für sulfokonjugierte Steroide während dieser Zeit stark erhöht sind [Hill et al., 2010a; Hill et al., 2010b]. Besonders die Werte von PregS und DHEAS, die neben AnS die dominierenden, sulfokonjugierten Steroide im Organismus darstellen, waren im Blut der Umbilikal-Arterie, im Vergleich zu ihren nicht sulfokonjugierten Formen, deutlich höher [Labrie et al., 2003; Mathur et al., 1980; Hill et al., 2010a; Müller et al., 2015].

Der Transport von Steroid-Sulfaten aus dem fetalen Kreislauf in die Zellen der Plazenta muss durch plazentare Transporter, wie z. B. OATP2B1, OAT4 und SOAT vermittelt werden [Schweigmann et al., 2014; Ugele et al., 2003; Ugele et al., 2008; St-Pierre et al., 2002].

Das im mütterlichen Blut zirkulierende PregS kann in endokrinen Geweben als Vorläufer für verschiedene Steroidhormone genutzt werden [Komatsuzaki et al., 1987].

Darüber hinaus konnten Labrie et al. zeigen, dass verschiedene hormonabhängige, humane Krebsformen, wie z. B. Prostatakrebs (PK) und Brustkrebs (BK), nicht passiv von zirkulierenden Steroiden abhängig sind, sondern selber lokal Steroidhormone aus nicht aktiven, zirkulierenden Vorläufern erzeugen können [Labrie, 1991]. Zirkulierendes DHEAS kann beispielsweise in PK- bzw. BK-Gewebe als Vorläufer für die lokale Bildung von Androgenen und Östrogenen genutzt werden. SOAT, der als Aufnahmetransporter für sulfokonjugierte Steroide dient, wird besonders in hormonabhängigen Geweben exprimiert [Geyer et al., 2007; Fietz et al., 2013]. Diesem Transporter kommt daher vermutlich eine physiologische Funktion für die Versorgung dieser Gewebe mit Steroiden zu. In hormonabhängigen Tumoren, wie BK oder PK, könnte SOAT darüber hinaus auch pathophysiologisch von Bedeutung sein. Besser untersucht sind in dieser Beziehung jedoch OATPs. So wurde für einige OATPs beschrieben, dass ihre Expression bei bestimmten Krebsformen entweder nach oben oder nach unten reguliert wird. Z. B. ist die Expression von OATP2B1 im BK-Gewebe im Vergleich zu nicht malignem Brustgewebe niedriger [Wlcek et al., 2008]; die Transkriptionsniveaus von OATP1A2 waren in malignem BK-Gewebe höher als in benachbartem, nicht malignem Brustgewebe [Meyer zu Schwabedissen et al., 2008]; und eine OATP1B3-Expression wurde in PK-Gewebe, allerdings nicht in normalem Prostatagewebe oder benigner Prostatahyperplasie gefunden [Hamada et al., 2008].

OATPs transportieren jedoch eine Vielzahl verschiedener amphipathischer Verbindungen und sind daher im Transport nicht spezifisch für sulfatierte Steroide, wie SOAT [Obaidat et al., 2012]).

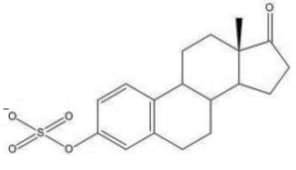
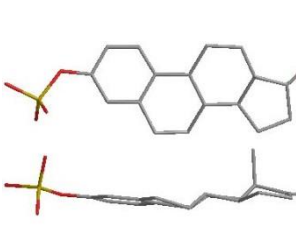
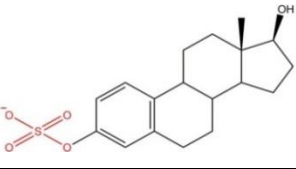
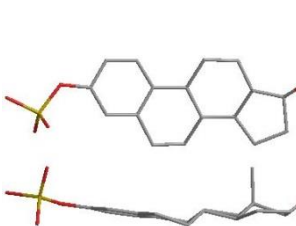
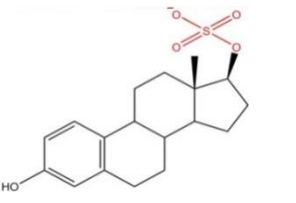
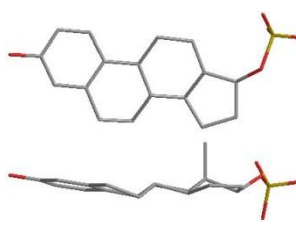
Mit Hilfe der hier präsentierten Daten können nun die strukturellen Anforderungen von SOAT-Substraten sowie die Abmessungen der mutmaßlichen SOAT-Bindungstasche weiter definiert werden. Während Konformationsänderungen des Steroidgrundgerüsts (z. B. für Gallensäuren in *cis-trans-trans*-Konformation) oder eine Glucuronid-Konjugation (z. B. 17 β -Estradiol-3-Glucuronid) einen Transport über SOAT verhindern, wird die Orientierung der Sulfatgruppe in C3 oder in C17 Position sowohl in α - als auch in β -Konformation akzeptiert. Dies lässt vermuten, dass die negativ geladene Sulfatgruppe, die mit SOAT vermutlich eine Wasserstoffbindung eingeht, sehr flexibel in der SOAT-Bindungstasche andocken kann.

In allen Transportversuchen wurden zwei verschiedene Negativkontrollen verwendet. SOAT-HEK293-Zellen wurden entweder mit Natrium-haltigem oder Natrium-freier Transportpuffer (Natrium-freie Kontrolle) inkubiert und alle Experimente wurden zusätzlich in HEK293-Zellen ohne das *gene of interest* (GOI) durchgeführt (Kontrollzellen).

Obwohl keine kinetischen Transportmessungen durchgeführt wurden, können die Transportraten der verschiedenen Substrate anhand ihrer Transportverhältnisse (Transport in Natrium-haltigem Puffer vs. Transport unter Natrium-freien Bedingungen) verglichen werden (Tabelle 1). Scheinbar beeinflusst nicht die Position der Sulfatgruppe an sich, sondern die Gesamtkonformation des sulfokonjugierten Steroids die Transportaktivität von SOAT.

Diese Strukturinformationen könnten helfen, bereits etablierte SOAT-Inhibitoren zu optimieren, die in der Therapie des hormonabhängigen Brust- oder Prostatakrebses relevant sein könnten [Grosser *et al.*, 2016].

TABELLE 1: SUBSTRATE VON SOAT/SOAT – ÖSTROGEN-SULFATE

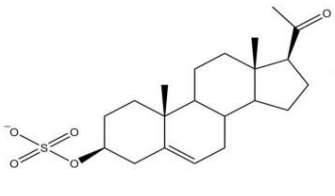
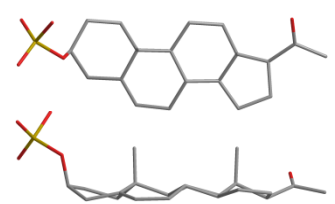
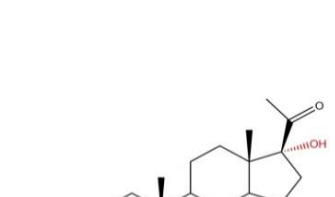
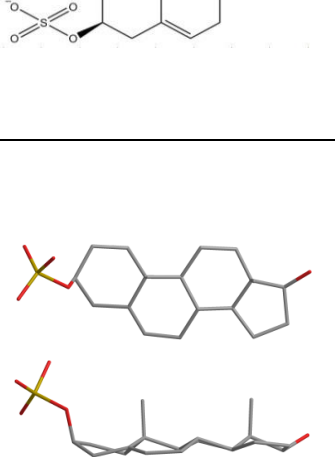
Name	Struktur	Position	MG (g/mol)	Transportratio
Estron-Sulfat (E ₁ S)		Aromatischer A-Ring	350,4	12,2 ^{#*}
		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe		
17β-Estradiol-3-Sulfat (E ₂ -3S)		Aromatischer A-Ring	374,4	19 ^{§^}
		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe Position 17': OH-Gruppe in β-Konformation		
17β-Estradiol-17-Sulfat (E ₂ -17S)		Aromatischer A-Ring	352,4	_§^
		Position 17': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation		

+ [Geyer et al., 2004] # [Geyer et al., 2007] § [Grosser et al., 2018]

* LSC

^ LC-MS/MS

TABELLE 2: SUBSTRATE VON SOAT/SOAT – GESTAGEN-SULFATE

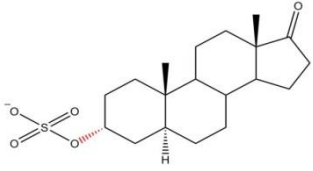
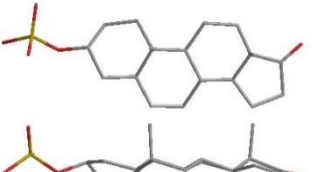
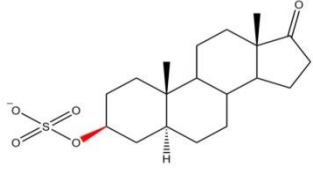
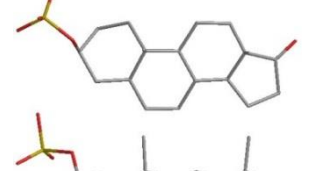
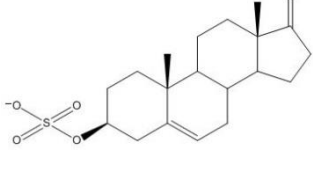

Name	Struktur	Position	MG (g/mol)	Transportratio
Pregnenolon-Sulfat (PregS)		Doppelbindung zwischen Positionen 5' + 6'	418,5	6 ^{§ ^}
		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation		
17α-Hydroxy-Pregnenolon-Sulfat (17α-OH-PregS)		Doppelbindung zwischen Positionen 5' + 6'	412,5	_§ ^
		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation Position 17': OH-Gruppe in α-Konformation		

+ [Geyer et al., 2004] # [Geyer et al., 2007] § [Grosser et al., 2018]

* LSC

^ LC-MS/MS

TABELLE 3: SUBSTRATE VON SOAT/SOAT – ANDROGEN-SULFATE

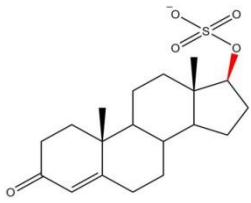
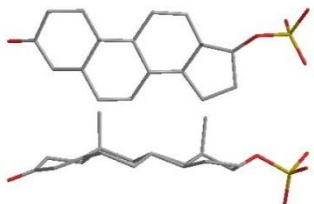
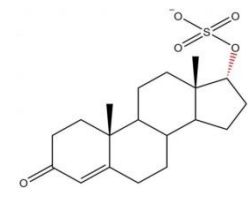
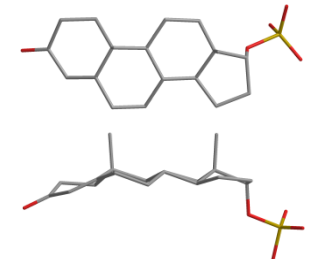
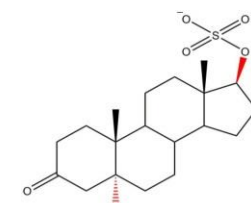
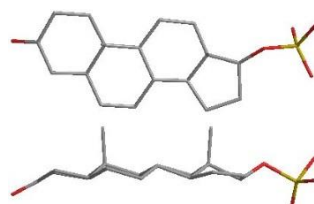
Name	Struktur	Position	MG (g/mol)	Transportratio
Androsteron-Sulfat (AnS)		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in α-Konformation	370,5	20 ^{§ ^}
		Position 5': Zusätzliches H ⁺ -Ion in α-Konformation		
Epiandrosteron-Sulfat (epiAnS)		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation	392,5	35 ^{§ ^}
		Position 5': Zusätzliches H ⁺ -Ion in α-Konformation		
Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHEAS)		Position 3': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation	368,5	10,2 ^{# *}
		Doppelbindung zwischen Positionen 5' + 6'		

+ [Geyer et al., 2004] # [Geyer et al., 2007] § [Grosser et al., 2018]

* LSC

^ LC-MS/MS

TABELLE 3: SUBSTRATE VON SOAT/SOAT – ANDROGEN-SULFATE (FORTSETZUNG)

Name	Struktur	Position	MG (g/mol)	Transportratio
Testosteron-Sulfat (TS)		Position 17': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation	368,5	6 [§] ^
				
Epitestosteron-Sulfat (epiTS)		Position 17': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in α-Konformation	469,7	5 [§] ^
				
5α-Dihydrotestosteron-Sulfat (DHTS)		Position 17': SO ₄ ²⁻ -Gruppe in β-Konformation	370,5	11 [§] ^
				

+ [Geyer et al., 2004] # [Geyer et al., 2007] § [Grosser et al., 2018]

* LSC

^ LC-MS/MS

3.3. SOAT: GEWEBEEEXPRESSION IN MENSCH UND MAUS

Die Hydrolyse von Steroid-Sulfaten durch die StS dient als wichtiger Schritt für die lokale Bereitstellung aktiver Androgene und Östrogene in hormonabhängigen Geweben (Sulfatase Syntheseweg) [Selcer *et al.*, 2002; Pasqualini, 2005]. Die Expression von StS und/oder SULT in bestimmten hormonproduzierenden bzw. hormonabhängigen Organen wie dem Hoden kann auch einen Hinweis auf die Anwesenheit und Aktivität von Transportern wie SOAT/Soat geben, da eine Reaktivierung der sulfokonjugierten Steroide zu biologisch aktiven Formen ihre Aufnahme in die Zelle voraussetzt [Labrie *et al.*, 2001; Strott, 2002]. Die Leydig-Zellen im adulten Hoden sind die Hauptquelle von testikulären Androgenen und Östrogenen über *de novo* Biosynthese [Hess, 2003]. Darüber hinaus kann der menschliche Hoden auch Steroid-Sulfate wie PREGS, DHEAS und TS produzieren [Laatikainen *et al.*, 1971; Ruokonen *et al.*, 1972; Mouhadjer *et al.*, 1989].

Interessanterweise kommt unter den männlichen Patienten mit rezessiver X-chromosomaler Ichthyose (RXLI) in Folge eines genetisch bedingten StS-Mangels ein gewisser Anteil mit assoziierten Hodenkrankheiten einschließlich Kryptorchismus und erhöhter Steroid-Sulfat-Werte vor [Lykkesfeldt *et al.*, 1985a; Lykkesfeldt *et al.*, 1985b; Lykkesfeldt *et al.*, 1985c]. Dies deutet darauf hin, dass die Rekrutierung von sulfokojugierten Steroiden über den *sulfatase pathway* zur Aufrechterhaltung der normalen Spermatogenese bei Männern beitragen könnte [Selcer *et al.*, 2002; Fietz *et al.*, 2013].

In mRNA-Expressionsanalysen zeigte SOAT eine hohe Expression im Hoden und wurde auch in Haut, Niere, Vagina, Pankreas, Nebenniere und Brust nachgewiesen [Fietz *et al.*, 2013]. In der Maus zeigte Soat eine hohe Expression in Lunge, Haut und Hoden, sowie eine moderate Expression in Herz und Blase [Grosser *et al.*, 2013]. Um die spezifische Gewebe-Expression von SOAT systematisch zu analysieren, wurden menschliche cDNA-Panels verwendet und Hodenbiopsien von Probanden mit intakter Spermatogenese analysiert. Alle Biopsien zeigten sehr hohe Expressionsniveaus von SOAT. Im weiteren Verlauf wurde das SOAT-Protein mittels Immunhistochemie in histologischen Schnitten des Hodens angefärbt. Die Keimzellstadien, in denen das SOAT-Protein gefunden wurde, umfassen sowohl primäre Spermatozyten des Stadiums V, Pachytän-Spermatozyten aller Stadien (I-V), sekundäre Spermatozyten des Stadiums VI, sowie runde Spermatisen (1. und 2. Ordnung) der Stadien I und II. Am prominentesten war das Signal in primären Spermatozyten erkennbar, die die Keimzellen innerhalb der ersten meiotischen Teilung repräsentieren [Fietz *et al.*, 2013]. Auch in der Maus wurde das Soat-Protein besonders in Spermatozyten und Spermatisen detektiert [Grosser *et*

al., 2013], was darauf schließen lässt, dass SOAT/Soat im Hoden von Mensch und Maus die gleiche Funktion einnimmt.

Im Rahmen der Untersuchung von Hodenbiopsien von Patienten mit verschiedenen Störungen der Spermatogenese wurde gezeigt, dass die SOAT-Expression in diesen Fällen oft sehr gering oder gar nicht vorhanden war. Dies gilt z. B. für Arreste auf Ebene der Spermatozyten oder Spermatogonien, sowie für das sog. *sertoli cell only* Syndrom (SCO). Diese Pathologien können zu einer nicht-obstruktiven Azoospermie und damit zu Unfruchtbarkeit bei Männern führen [Bergmann, 2005]. Auch bei Patienten mit diagnostizierter Hypospermatogenese, welche sich durch eine qualitativ konservierte, aber quantitativ reduzierte Spermatogenese auszeichnet, war die SOAT-Expression, im Vergleich zu Probanden mit intakter Spermatogenese, signifikant vermindert [Fietz *et al.*, 2013]. Da eine Reduktion der SOAT-Expression mit einem gestörten Transport von sulfokonjugierten Steroiden einhergehen kann, könnte in diesen Fällen auch die lokale Versorgung mit Androgenen und Östrogenen gestört sein. Aus diesen Untersuchungsbefunden kann jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen einer niedrigen SOAT-Expression und einer schweren Beeinträchtigung der Spermatogenese mit eventuell folgender Unfruchtbarkeit abgeleitet werden.

3.4. SOAT: POLYMORPHISMEN UND GENETISCHE VARIANTEN

Basierend auf der Hypothese, dass SOAT/Soat eine Rolle für die lokale Versorgung des Hodens mit Steroiden spielt und einen Einfluss auf die männliche Fruchtbarkeit hat, wurden zwei Strategien verfolgt:

Zum einen wurde eine Analyse der genetischen Varianten des menschlichen *SLC10A6*-Gens durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob funktionsbeeinträchtigende SOAT-Varianten vorkommen und wenn ja, ob diese mit einer gestörten Spermatogenese korreliert sein könnten (**Publikation #2**). Zum anderen wurde ein *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modell etabliert, um Physiologie und Pathophysiologie des Transporters in Bezug auf Reproduktionsverhalten, Fertilität und Samenqualität *in vivo* zu evaluieren (**siehe Publikation #3**).

Im Verlauf der letzten fünf bis zehn Jahre sind eine Vielzahl von genetischen Varianten im menschlichen *SLC10A6*-Gen bekannt geworden. Genetische Varianten bzw. Polymorphismen sind

in speziellen Datenbanken als Listen hinterlegt und einsehbar. Den in der vorliegenden Arbeit analysierten Varianten liegt eine Datenbank-Suche in der SNP (Einzelnukleotidpolymorphismus, *single nucleotide polymorphism*) -Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) zugrunde.

Mit „Polymorphismus“, oder „Einzelnukleotidpolymorphismus“ (SNP), werden Variationen der DNA-Sequenz bezeichnet, die durch verschiedene Mutationen, wie z. B. durch eine Nukleotid-Substitution, Insertion oder Deletion, hervorgerufen werden können. Innerhalb einer Population können diese unterschiedlich häufig auftreten. Statistisch betrachtet stellen SNPs 90% aller Polymorphismen im menschlichen Genom dar und tauchen etwa alle 300-1000 Basenpaare im Genom auf [Collins *et al.*, 1998].

Der genetische Code repräsentiert ein redundantes System, was bedeutet, dass eine Aminosäure durch verschiedene Basen-Triplets kodiert werden kann. Tritt an einer bestimmten Stelle eine Mutation, wie z. B. ein SNP auf, können drei verschiedene Resultate daraus hervorgehen: Wenn das veränderte Triplet für die gleiche Aminosäure kodiert und sich die Aminosäure infolgedessen nicht verändert, treten in der Regel keine Folgen auf. Solche Varianten werden als *silent* oder *synonymous* bezeichnet. Außerdem kann eine Mutation dazu führen, dass infolge einer Sequenzveränderung ein vorzeitiges Stopp-Codon in der Basenabfolge auftritt, was dazu führen kann, dass das Protein nicht oder nur teilweise produziert wird. Solche Varianten werden als *nonsense* bezeichnet. Wenn eine Veränderung der Basenabfolge zu einem Austausch der an dieser Stelle ursprünglichen Aminosäure führt, spricht man von einer *missense*, oder *non-synonymous* Variante. Eine solche *missense* Variante kann die Eigenschaften und Funktionen des Proteins beeinflussen. Infolgedessen kann es zu Unterschieden zwischen Individuen einer Population kommen und Eigenschaften wie Gewicht, Größe oder Risikoprofil für bestimmte Krankheiten werden geprägt.

Die international anerkannte Nomenklatur für *missense* Polymorphismen beschreibt eine individuelle Namensgebung, die sich jeweils aus zwei Buchstaben und einer Zahl zusammensetzt: An erster Stelle steht der Buchstabencode der ursprünglichen Aminosäure, gefolgt von ihrer Position im ORF (offener Leserahmen, *open reading frame*) des Proteins. An letzter Stelle steht der Buchstabencode der Aminosäure, die sich aus dem veränderten Basentriplet ergibt. So ergibt sich beispielsweise der Name A83V für eine Variante an Position 83, bei der die Aminosäure Alanin gegen Valin ausgetauscht wird. Als Polymorphismen gelten Mutationen, die eine *minor allele frequency*

(MAF) von $>0,01$ aufweisen und damit häufiger vorkommen als die selteneren genetischen Varianten, die durch eine MAF von $\leq 0,01$ definiert sind.

Die SOAT-Expression ist, wie bereits erwähnt, bei verschiedenen Störungen der Spermatogenese signifikant vermindert. Die daraus resultierende Abnahme des SOAT-vermittelten Transports von sulfokonjugierten Steroiden könnte an der Beeinträchtigung der funktionellen Spermatogenese beteiligt sein. Es ist allerdings nicht klar, ob eine verminderte SOAT-Expression kausal für diese Störungen ist, oder ob z. B. durch eine verminderte Anzahl an Spermatisden und Spermatozyten im Verlauf einer Hypospermatogenese, auch das Vorhandensein von SOAT vermindert ist.

SOAT könnte eine Rolle für die lokale Versorgung mit Steroiden im Hoden spielen und damit auch einen Einfluss auf die männliche Fruchtbarkeit nehmen.

Abgesehen von einer möglichen Herunterregulation der mRNA-Expression können genetische Varianten im *SLC10A6*-Gen die Transportfunktion beeinflussen und damit einen ähnlichen, negativen Effekt auf die Spermatogenese haben.

Aus diesem Grund wurde in Publikation #2 nach funktionell relevanten Varianten im menschlichen *SLC10A6*-Gen gesucht. Es ist möglich, dass es eine Korrelation zwischen einer gestörten Spermatogenese und bestimmten, in der Natur auftretenden Varianten gibt. Darüber hinaus sollte das Auftreten von *in vitro* funktionsbeeinträchtigenden Varianten auch bei Patienten mit eingeschränkter Spermatogenese im Vergleich zu Patienten mit intakter Spermatogenese analysiert werden.

Um einen aktuellen Überblick über die natürlich vorkommenden genetischen Varianten des menschlichen *SLC10A6*-Gens zu erhalten, wurde die SNP-Datenbank des NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) durchsucht. In einer früheren Studie wurden bereits einige häufiger auftretende und länger bekannte genetische Varianten von SOAT analysiert und ihr Zusammenhang mit verschiedenen Störungen der Spermatogenese untersucht. Zu diesem Zeitpunkt waren nur einige wenige SOAT-Polymorphismen bekannt: S6F, I114V, R185T, I196T, V199I und L204F [Bakhaus et al., 2018a]. Unter diesen zeigte nur SOAT L204F eine signifikant beeinträchtigte Transportfunktion, höchstwahrscheinlich durch eine gestörte Plasmamembran-Expression. Da dieser Polymorphismus allerdings sowohl bei Probanden mit intakter Spermatogenese, als auch bei Probanden mit Hypospermatogenese mit nahezu identischen Allel-

Frequenzen nachgewiesen wurde, konnte er nicht als ursächlich für eine Hypospermatogenese angesehen werden.

Nichtsdestotrotz lässt dieser Befund keine abschließende Aussage über die Rolle von SOAT für die männliche Fertilität und Fortpflanzung zu, da die Hypospermatogenese nur eine von vielen histomorphometrischen Pathologien des Hodens darstellt und der Polymorphismus SOAT-L204F darüber hinaus eine verbleibende Resttransportaktivität aufwies [Bakhaus *et al.*, 2018a].

Aus diesem Grund wurden in der nachfolgenden Analyse auch seltenere genetische Varianten von SOAT untersucht, deren Entdeckung größtenteils durch das *1000 Genome Project* gefördert wurde (<http://www.1000genomes.org/>).

Zur Zeit des zweiten Suchlaufs wurden insgesamt >350 Varianten im *SLC10A6*-Gen detektiert. Diese Liste wurde durch eine Beschränkung auf die im offenen Leserahmen lokalisierten Varianten auf 148 reduziert. Als weiteres Kriterium wurden nur die Varianten konservierter Aminosäuren ausgewählt. Schlussendlich wurden über bioinformatische Analyseverfahren, mittels der *PolyPhen*- und *SIFT* (*sorting intolerant from tolerant*) Algorithmen, 24 Varianten herausgefiltert, die durch beide Programme als möglicherweise schädigend kategorisiert wurden.

3.4.1. POLYPHEN

PolyPhen ist ein frei zugängliches bioinformatisches Programm, welches sich der automatischen funktionellen Annotation von codierenden SNPs widmet. Nach Ramensky charakterisiert der *PolyPhen* zugrundeliegende Algorithmus sequenzbasiert die Substitutionsstelle der Polymorphismen [Ramensky *et al.*, 2002]. Die Substitution kann dabei an einer spezifischen, funktionsrelevanten Position des Proteins auftreten, oder in einer nicht spezifizierten Region. Das Protein wird durch seine SWALL-Zugangsnummer, seine ID oder durch die Sequenz selbst identifiziert [Ramensky *et al.*, 2002]. *PolyPhen* überprüft, ob der Aminosäureaustausch an einer Stelle stattfindet, die in der SWALL-Datenbank entweder als Disulfid-, Thiolester-, Thiolether-, Fett- oder Metallionenbindungsstelle gekennzeichnet ist. Außerdem wird festgestellt, ob der Austausch an einer möglichen Glycosylierungs- oder Phosphorylierungsstelle stattfindet, oder im Bereich einer

TMD [Krogh *et al.*, 2001] oder einer Signalstelle [Nielsen *et al.*, 1997] liegt. Nachfolgend wird ermittelt, ob die Substitutionsstelle in räumlichem Kontakt mit einer dieser kritischen Bindungsstellen steht, zumindest dann, wenn der Sequenz ein homologes Protein mit bekannter 3D-Struktur zugeordnet werden kann.

3.4.2. SIFT (*SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT*)

Das online Programm *SIFT* repräsentiert einen mehrstufigen Algorithmus, der einen Sequenzhomologie-basierten Ansatz zur Klassifizierung von Aminosäuresubstitutionen verwendet [Ng *et al.*, 2000]. Laut Kumar *et al.* kompiliert *SIFT* für eine gegebene Proteinsequenz einen Datensatz von funktionell verwandten Proteinsequenzen durch das Durchsuchen von Proteindatenbanken und unter Verwendung des *PSI-BLAST-Algorithmus* [Kumar *et al.*, 2009]. Es baut dann eine Ausrichtung der homologen Sequenzen mit der Abfragesequenz auf. Im zweiten Schritt berechnet *SIFT* jede Position im Alignment und berechnet die Wahrscheinlichkeiten für alle möglichen 20 Aminosäuren an dieser Position. Diese Wahrscheinlichkeiten werden durch die Wahrscheinlichkeit der häufigsten Aminosäure normalisiert und in einer skalierten Wahrscheinlichkeitsmatrix aufgezeichnet. *SIFT* prognostiziert eine Substitution zur Beeinflussung der Proteinfunktion, wenn die skalierte Wahrscheinlichkeit, auch *SIFT score* genannt, unterhalb eines bestimmten Schwellenwertes liegt. Im Allgemeinen ist eine stark konservierte Position gegenüber den meisten Substitutionen intolerant, während eine schlecht konservierte Position die meisten Substitutionen tolerieren kann.

3.4.3. TRANSPORTAKTIVITÄT UND PLASMAMEMBRAN-EXPRESSION DER SOAT-VARIANTEN

Die Liste der so ermittelten SOAT-Varianten wurde um sieben Mutationen erweitert, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führen (*frameshift*-Mutationen). Insgesamt umfasste die Liste also 31 SOAT-Varianten. Die in der vorherigen Studie [Bakhaus *et al.*, 2018a] analysierten Varianten wurden dabei nicht erneut mit einbezogen.

Ziel dieses Teilprojektes war es, für alle Varianten sowohl die Transportaktivität sowie die Plasmamembran-Expression und die Gesamtprotein-Expression zu untersuchen (**siehe Publikation #2**).

Überraschenderweise zeigten nahezu alle Varianten eine signifikant reduzierte Transportaktivität für [³H]DHEAS und viele der Varianten waren sogar vollständig Transport-negativ. Im Gegensatz dazu war die Plasmamembran-Expression nur bei wenigen SOAT-Varianten, darunter die *frameshift*-Mutationen, beeinträchtigt.

Da eine reduzierte Plasmamembran-Expression ebenfalls einen negativen Effekt auf die Transportrate hat, aber ein beeinträchtigter Transport nicht notwendigerweise auch die Plasmamembran-Expression beeinflusst, wurden drei verschiedene Kategorien der SOAT-Varianten etabliert, in denen alle Daten aus der Transport- und der Oberflächenexpressionsanalyse kombiniert wurden:

1a) DHEAS-Transportaktivität unbeeinflusst und Plasmamembranexpression über 50%

1b) Transportaktivität über 50% und Plasmamembranexpression über 50%

2a) Beeinträchtigte Transportaktivität unter 50%, aber Plasmamembranexpression über 50%

2b) Keine Transportaktivität für [³H]DHEAS, aber Plasmamembranexpression über 50%

3) Beeinträchtigte Plasmamembranexpression und fehlende Transportaktivität

Alle SOAT-Varianten wurden außerdem in einem 3D-Homologiemodell des humanen SOAT, basierend auf den Kristallstrukturen der bakteriellen Homologe von *neisseria meningitides* (ASBT_{NM}) und *yersinia frederiksenii* (ASBT_{YF}), lokalisiert [Hu et al., 2011]. Sowohl SOAT als auch ASBT sind durch einen strikt Natrium-abhängigen Transport gekennzeichnet und teilen an den mutmaßlichen Natrium-Bindungsdomänen hoch konservierte Aminosäuren.

Insgesamt wurden fünf Varianten der Kategorie 3 identifiziert (A83V, P107L, G241D, G263E und Y308N). Eine genauere Analyse dieser Varianten innerhalb des SOAT-Homologiemodells ergab, dass sich die meisten von ihnen in der Peripherie der Core-Domäne befinden. Der Transportmechanismus der *SLC10*-Transporter basiert wahrscheinlich auf alternierenden

Konformationen der Substratbindungsstelle, welche einmal nach extra- und einmal nach intrazellulär lokalisiert sein kann. Dadurch wird der Substrattransport von extra- nach intrazellulär erreicht. Die Panel-Domäne scheint während der Konformationsänderung flexibler zu sein als die Core-Domäne [Alhadeff *et al.*, 2015; Drew und Boudker, 2016].

Auf Grund dessen tritt die Homodimerisierung, die während des Sortierprozesses des SOAT-Proteins in die Plasmamembran auftritt, wahrscheinlicher an der unflexibleren Core-Domäne auf [Bijssmans *et al.*, 2012]. Eventuell induzieren die Varianten der Kategorie 3 Konformationsänderungen, welche die Homodimerisierung von SOAT und somit auch den Transport negativ beeinflussen könnten.

Die meisten Varianten der Kategorie 2b befinden sich direkt an oder in nächster Nähe der mutmaßlichen Natrium-Bindungsdomänen von SOAT. Dies gilt insbesondere für die Varianten mit fehlender Transportaktivität (G109S, S112F, N113K und S133F). Aus den bakteriellen Homologen ist bekannt, dass bestimmte hochkonservierte Aminosäuren während des Transportzyklus an der Bindung der beiden Natrium-Ionen beteiligt sind. Die meisten dieser Aminosäuren sind unter den *SLC10*-Transportern hoch konserviert und sind auch in SOAT an den entsprechenden Positionen vorhanden (**Publikation #2**).

Da einige der SOAT-Varianten diese Aminosäuren direkt betreffen (Q75R, S112F und N113K) und andere in unmittelbarer Nähe zu diesen Natrium-Bindungsdomänen lokalisiert sind (P107L, G109S, S133F und G263E), ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Varianten die Transportaktivität von SOAT beeinflussen, indem die Natrium-Bindung negativ beeinträchtigt wird. Weitere Belege für die wichtige Rolle der Aminosäuren, die sich in unmittelbarer Nähe der Natrium-Bindungsdomäne befinden, zeigen sich in Mutagenese Studien an den Carriern ASBT und NTCP [Oelkers *et al.*, 1997; Zahner *et al.*, 2003].

Wie erwartet ist die Transportfunktion von SOAT in allen *frameshift*-Mutationen, mit Ausnahme von nt1113(insA), komplett aufgehoben. Dies liegt vermutlich in der Trunkation von strukturell und/oder funktionell wichtigen Domänen begründet. Darüber hinaus könnten *off-frame* Aminosäuren, die durch die Leserahmenverschiebung entstehen, einen direkten negativen Effekt auf die Transportfunktion von SOAT haben.

In der *frameshift*-Mutation nt1113(insA) ist die SOAT-WT Sequenz bis zum ersten Viertel des C-Terminus erhalten. Nur die letzten 55 Aminosäuren werden gelöscht und durch 26 *off-frame*

Aminosäuren ersetzt. Das vorzeitige Stopcodon führt zu einer gestörten Plasmamembran-Expression des Proteins, was die Vermutung nahelegt, dass der C-Terminus des SOAT-Proteins eine Rolle für das Sorting in die Plasmamembran spielt. Nichtsdestotrotz besteht in dieser *frameshift*-Mutation eine Rest-Transportaktivität für DHEAS, was vermuten lässt, dass immer noch eine gewisse Fraktion richtig in der Plasmamembran exprimiert wird und damit die Transportaktivität aufrechterhält. Dieser Befund könnte bedeuten, dass der C-Terminus des SOAT-Proteins eher für das Sorting in die Plasmamembran eine Rolle spielt, als für den Transport-Prozess (**Publikation #2**).

Unter allen analysierten Varianten zeigten nur M140I und S151F eine unveränderte Transportaktivität und eine normale Expression in der Plasmamembran. Entweder spielen die Aminosäuren an diesen Positionen weder für die korrekte Plasmamembran-Expression, noch für den Transport-Prozess von SOAT eine große Rolle, oder die neu entstandenen Aminosäuren (Isoleucin an Position 140 und Phenylalanin an Position 151) haben keinen negativen Einfluss auf diese Funktionen. Beide Varianten befinden sich in der Transmembrandomäne (TMD) 5, die während der Konformationsänderung zwischen Panel- und Core-Domäne im Verlauf des Transport-Prozesses eine gewisse Flexibilität braucht [Alhadeff et al., 2015; Drew und Boudker, 2016]. Aus diesem Grund könnte der Aminosäure-Austausch an diesen Positionen tolerierbar für die Proteinfunktionen sein.

Ob die *loss-of-function* Varianten im SOAT häufiger bei Probanden mit gestörter Spermatogenese oder Infertilität auftreten, muss in weiteren Studien untersucht werden. Für den SOAT-Polymorphismus L204F wurde dies bereits getestet [Bakhaus et al., 2018a]. Leider ist die Analyse von über 30 Varianten hinsichtlich ihres Auftretens bei verschiedenen Störungen der Spermatogenese sehr aufwändig, sowie zeit- und kostenintensiv. Eine Reduktion der Anzahl auf die in Kategorie 2a und 2b zusammengefassten Varianten wäre zunächst zu empfehlen.

3.5. SOAT KNOCKOUT MAUS

Da eine signifikante Reduktion der SOAT-mRNA-Expression bei verschiedenen Störungen der Spermatogenese im Menschen gefunden wurde [Fietz et al., 2013; Bakhaus et al., 2018b], wurde neben der Analyse funktionell relevanter, genetischer Varianten von SOAT ein *Slc10a6*-Knockout-

Maus-Modell etabliert, um die Rolle von Soat im Reproduktionsgeschehen zu untersuchen (**siehe Publikation #3**).

Die Knockout-Maus wurde über zielgerichtete homologe Rekombination generiert und über zweieinhalb Jahre und mehrere Generationen auf einen *C57 Bl/6*-Hintergrund zurück gekreuzt.

In einer ersten Charakterisierung der *Slc10a6*-Knockout-Maus lag der Fokus auf der Evaluierung der Folgen einer kompletten Abwesenheit des Soat-Proteins für Spermatogenese und Reproduktion in der Maus. Wie bereits erwähnt wirkt Soat als spezifischer Aufnahme-Transporter für die sulfokonjugierten Vorstufen der Steroidhormone. Diese inaktiven Vorstufen können intrazellulär z. B. in den Keimzellen des Hodens durch die StS reaktiviert werden und so einen intrakrinen Effekt auf die männliche Reproduktion beisteuern [Labrie, 2015].

Es ist bekannt, dass Spermatogenese und männliche Fruchtbarkeit abhängig von hormoneller Regulation sind und es gibt Hinweise auf eine Beteiligung der sulfokonjugierten Steroidhormone an diesen Prozessen [Ruokonen et al., 1972; Payne und Jaffe, 1975; Geyer et al., 2017]. Es ist denkbar, dass SOAT/Soat eine funktionelle Rolle in der lokalen Versorgung mit Steroiden im Hoden spielt. Allerdings zeigte die *Slc10a6*-Knockout-Maus keine sichtbaren Verhaltens-Anomalien, sie zeigt weder einen belastenden Phänotyp, noch eine verkürzte Lebenszeit oder ein abweichendes Gewicht. Außerdem ist diese Mauslinie fertil, selbst ko x ko Verpaarungen erzeugen Nachkommen. Trotzdem wurden Motilität und Morphologie der Spermien geschlechtsreifer Mäuse genauer untersucht. Durch die *computer assisted sperm analysis* (CASA) kann zwar keine Vorhersage über die Fruchtbarkeit der Individuen gemacht werden, es lassen sich allerdings wichtige Informationen hinsichtlich der Spermien-Qualität ermitteln [Amann und Waberski, 2014].

Leider brachte die Spermien-Analyse der *Slc10a6*-Knockout-Maus jedoch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Spermien-Anzahl, -Morphologie oder -Motilität zu Tage. Lediglich ein Trend hinsichtlich insgesamt schlechterer Qualitätswerte war bei den Knockout Mäusen zu erahnen. Aus diesem Grund wurde eine histomorphometrische Analyse des Hodens der *Slc10a6* Knockout Mäuse mit einem Spermatogenese-Staging durchgeführt. Im normalen Hodengewebe gibt das Auftreten bestimmter Spermatogenese-Stadien einen Aufschluss über die Länge des Entwicklungskreislaufs des Hodenkanälchen-Epithels [Russell et al., 1990]. In unserer Analyse konnte jedoch kein Unterschied zwischen Knockout- und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Die Häufigkeit, mit der Hodenkanälchen mit Störungen auftraten, besonders solche mit fehlenden

Generationen (*missing generations*), schien bei den Knockout Mäusen dennoch erhöht, allerdings ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen (**Publikation #3**).

Allein die Abwesenheit von Soat im Organismus führt also nicht zu einer gestörten Spermatogenese oder zu Unfruchtbarkeit. Man muss jedoch mit in Betracht ziehen, dass ein so komplexes Geschehen wie eine manifestierte Störung der Spermatogenese nicht von nur einem Parameter abhängen kann, sondern dass hier vermutlich ein multifaktorieller Prozess vorliegt [Cooke und Saunders, 2002]. Nur selten liegt in diesem Fall eine einzige Genmutation zu Grunde [Ferlin et al., 2007]. Ein Beispiel hierfür wäre der Knockout des *gap junction protein alpha 1* (Gja1) Gens, welches für *connexin43* codiert. Diese Mutation resultiert tatsächlich in einem direkten Zusammenbruch der Spermatogenese [Carette et al., 2010; Gerber et al., 2016]. Soat könnte eine eher regulatorische Funktion im Hoden einnehmen und so könnte ein Knockout des *Slc10a6*-Gens kompensiert werden, z. B. durch eine Hochregulation anderer Steroid-Sulfat-Transporter der OATP-Familie [Roth et al., 2012].

Darüber hinaus liegt der *Slc10a6*-Knockout konstitutiv vor, was für eine angeborene Kompensation sprechen könnte, da dieser Knockout nicht erst konditionell erworben wird. Eine kompensatorische Hochregulation ist auch aus anderen Transporter-Knockout-Mäusen bekannt. Beispielsweise wurde eine Hochregulation des *organic cation transporters* OCT3, mit Transportaktivität für Serotonin, in Folge eines *Slc6a4*-Knockouts beschrieben [Chen et al., 2001; Schmitt et al., 2003]. Möglicherweise werden auch in den *Slc10a6*-Knockout-Mäusen andere Transporter von sulfokonjugierten Steroidhormonen als Antwort auf die fehlende Soat-Expression im Hoden hochreguliert. Denkbar wären hier verschiedene Transporter aus den Familien der *organic anion transporting polypeptides* (OATPs) und der *organic anion transporter* (OATs). Um diese Theorie zu überprüfen, sollten noch weitere Untersuchungen hinsichtlich des Genexpressionsprofils der *Slc10a6* Knockout Maus im Vergleich zum Wildtyp gemacht werden und immunhistochemisch gezielt nach den fraglichen OATPs und OATs in Hodengewebschnitten gesucht werden.

Um die Rolle von Soat für den Steroid-Sulfat-Transport in der Maus aus einer weiteren Perspektive zu beleuchten, wurde eine Steroidprofil-Analyse von männlichen und weiblichen *Slc10a6*-Knockout und Wildtyp-Mäusen anhand von Serumproben durchgeführt. Für die Analyse von 12 sulfokonjugierten Steroiden wurde die LC-MS/MS eingesetzt und zur Bestimmung von 9 weiteren, unkonjugierten Steroiden wurde die GC-MS/MS verwendet [Sanchez-Guijo et al., 2013; Sanchez-

Guijo et al., 2015b]. In allen Serumproben konnten jedoch nur Cholesterin-Sulfat (CS), Testosteron (T) und Kortikosteron in quantifizierbaren Mengen nachgewiesen werden. Alle anderen getesteten Substanzen lagen entweder unterhalb der Quantifizierungsgrenze oder waren im Maus-Serum nicht nachweisbar. Kortikosteron wurde insgesamt am häufigsten nachgewiesen, während Testosteron das dominante Androgen in den Analysen des Serums der männlichen Tiere repräsentierte. Die Spiegel beider Steroide lagen im Bereich früherer Studien [*McNamara et al.*, 2010; *Weng et al.*, 2010; *Nilsson et al.*, 2015], zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Slc10a6*-Knockout und -Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu war CS im Serum der männlichen *Slc10a6*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den *Slc10a6*-Wildtyp-Mäusen signifikant erhöht, zeigte allerdings bei den weiblichen Mäusen vergleichbare Werte (**Publikation #3**).

CS ist ein wichtiger Bestandteil der Spermatozoen [*Lalumiere et al.*, 1976] und wirkt als Plasmamembranstabilisator und potenter Inhibitor der akrosomalen Proteinase Acrosin der Spermien [*Burck und Zimmerman*, 1980]. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Spaltung des Spermien-assoziierten CS innerhalb des weiblichen Reproduktionstraktes stattfindet, wo es für die Permeabilisierung und die Befruchtung von Bedeutung sein könnte [*Langlais et al.*, 1981].

Da SOAT/Soat sowohl im Golgi-Kompartiment der Spermatozyten [*Fietz et al.*, 2013; *Grosser et al.*, 2013] als auch in der Plasmamembran der runden Spermatozyten lokalisiert wurde, könnte dieser Transporter an der Aufnahme und Akkumulation von CS in Golgi-Vesikeln beteiligt sein, die im späteren Verlauf ihrer Entwicklung die Akrosomen-Kappe bilden. Um diese Hypothese zu stützen, müsste jedoch bewiesen werden, dass SOAT/Soat in der Tat CS auf ähnliche Weise transportiert wie andere sulfokonjugierte Steroide, was bisher nicht gezeigt werden konnte. Neben dem Hoden ist CS von großer Bedeutung in der Haut [*Labrie et al.*, 2000; *Zouboulis*, 2000]. SOAT/Soat wurde bei der Maus immunhistochemisch in der Epidermis lokalisiert und könnte somit an diesem Prozess beteiligt sein [*Grosser et al.*, 2013]. Interessanterweise zeigen Patienten mit durch Steroidsulfatase-Mangel ausgelöster rezessiver X-chromosomaler Ichthyose (RXLI) Schuppen auf ihrer Haut, die durch hohe Konzentrationen von nicht gespaltenem CS und erhöhte Spiegel von Plasma-CS verursacht werden [*Shackleton und Reid*, 1989; *Sanchez-Guijo et al.*, 2015b]. Es ist möglich, dass der nicht-vorhandene SOAT/Soat-Transport von CS in der Haut in ähnlicher Weise erhöhte Plasma-CS-Spiegel verursachen kann. Eine pathohistologische Analyse der Haut von *Slc10a6*-Knockout-Mäusen wird hoffentlich weiterführende, interessante Ergebnisse bringen.

3.6. WEITERE UNTERSUCHUNGEN UND AUSBLICK

3.6.1. CHOLESTERIN-SULFAT

Die Sulfo-Konjugation spielt eine bedeutende Rolle in der Biotransformation vieler verschiedener endogener und exogener Verbindungen. Auch Cholesterin und viele Steroide unterliegen dieser Modifikation [Roberts, 1987].

Cholesterin-Sulfat ist beim Menschen quantitativ das bedeutendste Steroid-Sulfat und nimmt viele wichtige Funktionen im Organismus ein [Strott und Higashi, 2003]. Es wird durch die Steroid-Sulfotransferasen (SULTs) aus Cholesterin generiert und kann durch die StS in freies Cholesterin rekonvertiert werden. Außerdem kann es in sulfokonjugierter Form als Substrat für die Synthese von weiteren sulfokonjugierten Steroiden dienen, ohne dass dafür die Sulfatgruppe abgespalten werden muss [Roberts et al., 1964; Young und Hall, 1969; Hochberg et al., 1974a; Hochberg et al., 1974b]. Cholesterin-Sulfat hat sowohl Einfluss auf die Cholesterinsynthese, als auch auf die Spermien-Kapazitation [Langlais et al., 1981] und die Aktivität von Thrombin und Plasmin im Rahmen der Blutgerinnung [Iwamori et al., 1999]. Außerdem kann CS als regulatorisches Molekül wirken [Ikuta et al., 1994; Denning et al., 1995] und spielt eine Rolle für die Keratinozyten-Differenzierung sowie für die Entwicklung der epidermalen Barriere [Jetten et al., 1989; Kawabe et al., 1998].

Im Falle der RXLI (allerdings nicht bei anderen Formen der Ichthyose), sind die Plasmaspiegel von CS deutlich erhöht [Bergner und Shapiro, 1981; Epstein, Jr. et al., 1981; Serizawa et al., 1987]. Darüber hinaus sind diese hohen Plasmaspiegel auch mit erhöhten CS-Konzentrationen im *stratum corneum* der Epidermis assoziiert [Williams und Elias, 1981].

In der Haut befindet sich CS vorwiegend in der Epidermis. Es wird dort in den basalen und spinalen Schichten gebildet und erreicht seine höchste Konzentration im *stratum granulosum*. Im *stratum corneum* nimmt die CS-Konzentration dann im Verlauf der Desulfonierung durch die StS wieder ab [Lampe et al., 1983; Elias et al., 1984]. Diese „Wanderung“ des CS wird auch als "Epidermaler Cholesterin-Sulfat Zyklus" bezeichnet [Epstein et al., 1984].

Die Transportaktivität von SOAT/Soat für CS wurde in Transportexperimenten im Zellkultursystem untersucht. CS ist kommerziell nur in geringer Aktivität in radioaktiver Form erhältlich. Die Substanz

ist instabil und lässt sich in gängigen Zellkultur-geeigneten Lösungsmitteln nur bedingt in Lösung bringen.

Nichtsdestotrotz wurde die Transportaktivität in SOAT-/Soat-tranzfizierten HEK293 Zellen untersucht. Klassischer Weise beinhalten solche Transportexperimente einen Teil der zu testenden Substanz in nicht radioaktiv-markierter Form (Kaltsubstanz) und einen Teil der Substanz in radioaktiv-markierter Form („Heiß-Anteil“) in einem Transportpuffer. Auf diese Weise kann die Menge an eingesetzter Radioaktivität möglichst geringgehalten werden. Da CS jedoch besonders hydrophobe Eigenschaften aufweist und sich nicht wie andere Steroid-Sulfate zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) vorlösen lässt, wurde anfänglich versucht CS über den Lösungsvermittler 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (Cyclodextrin) im Transportpuffer in Lösung zu bringen.

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus mehreren Zuckermolekülen bestehen, die zu einem Ring geschlossen sind. Sie werden durch enzymatische Umwandlung aus Stärke synthetisiert und unter anderem in der Umwelttechnik, sowie in der Lebensmittel-, Pharma- und chemischen Industrie eingesetzt [Menuel et al., 2007; Thatiparti et al., 2010].

Auf Grund ihrer besonderen Struktur können Cyclodextrine die Löslichkeit von hydrophoben Molekülen verbessern, indem sie Komplexe mit diesen Verbindungen eingehen. Cyclodextrine sind zum Zentrum ihres Ringes hin hydrophob und nach außen gerichtet hydrophil. Sowohl α -, als auch β - und γ -Cyclodextrin werden von der *Food and Drug Administration* (FDA) allgemein als sicher anerkannt, was sie auch als ungefährliche Substanz für den Einsatz in der Zellkultur qualifiziert. Im Hinblick auf diese Eigenschaften ist es den gängigen, im Labor eingesetzten Lösungsmitteln wie DMSO, Ethanol (EtOH) und Methanol (MetOH) überlegen, da diese schon in geringen Dosen zelltoxisch wirken und sich darüber hinaus als ungeeignet zur Lösung von CS erwiesen haben.

Im ersten Versuchsansatz wurde die Löslichkeit von CS in einer Cyclodextrinlösung und, im Vergleich dazu, in verschiedenen lipophilen Medien (Mineralöl, Silikonöl, Rapsöl) getestet und die verschiedenen Transportlösungen im Zelltransportexperiment mit gleichen CS-Konzentrationen angewendet.

Um die lipophilen Öle mit dem wässrigen Transportpuffer zu vermischen, wurde ein Emulgator in Form von Lecithin angewendet. Leider konnte eine Fetttröpfchen-Bildung trotzdem nicht verhindert werden und dementsprechend suboptimal war das Verhalten der entsprechenden Transportlösungen auf den Zellen: Die Fett-Tröpfchen mit der gelösten Kaltsubstanz setzten sich an

der Oberfläche ab und konnten aus diesem Grund nicht zufriedenstellend die Zellen am Boden der Zellkulturschalen-Wells erreichen, wodurch Öle als Lösungsmittel ausgeschieden sind.

Im Falle des Cyclodextrins als Lösungsvermittler fiel auf, dass die Werte der Kontrollzellen überraschend hoch waren, was die Frage aufwarf, ob Cyclodextrin eine unspezifische Bindung mit der Zellmembran eingeht, oder ob eine nicht Transporter-gesteuerte Diffusion oder Endozytose des CS stattfinden könnte. Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuchsansatz mit Cyclodextrin auch der Überstand nach Inkubation gemessen und zusätzlich eine zeitabhängige Messreihe (1 min, 5 min, 30 min, 60 min) durchgeführt. Auch im folgenden Versuch waren die Kontrollwerte hoch, was sich auch in der Auswertung des Überstandes widerspiegelte. Darüber hinaus war auch bei sehr langer Inkubation keine Sättigung des Transports erkennbar. Daher kam auch Cyclodextrin als Lösungsvermittler für die Transportexperimente mit CS nicht in Frage.

Da CS im Körper im Serum gelöst nachweisbar ist, wurde im nächsten Anlauf ein Vergleich zwischen dem Transport von CS in klassischem Transportpuffer und in Zellkulturmedium mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) angestellt. Auch im Zellkulturmedium befinden sich ausreichende Mengen Natrium für den SOAT Transport. In mehrfachen Ansätzen zeigte sich jedoch eine inhomogene Verteilung von CS im Transportpuffer, was auch diesen Ansatz zunichte machte.

Aus diesen Befunden ergaben sich mehrere Fragen:

- Hat Cyclodextrin eine direkte Wirkung auf die Natrium-Konzentration im Medium?
- Hat Cyclodextrin eine hemmende Wirkung auf den SOAT-vermittelten Transport?
- Haftet das CS-Molekül am Cyclodextrin Ring oder wird es so fest darin eingeschlossen, dass es für Transportexperimente nicht mehr verfügbar ist?
- Kann CS mit einem Transporter interagieren, wenn es an Cyclodextrin gebunden ist?
- Interagiert oder bindet Cyclodextrin Transporter-unabhängig mit der Membran?
- Ist ein anderes Protein für den CS Transport verantwortlich?

Um zunächst auszuschließen, dass Cyclodextrin *per se* eine negative Wirkung auf den Transport hat oder in anderer Weise das Experiment behindert, wurde ein Transportexperiment mit DHEAS unter gleichen Bedingungen vorgenommen. Dazu wurde DHEAS, für welches eine bekannte und gut untersuchte Transportaktivität für SOAT/Soat besteht, sowohl mit Cyclodextrin, als auch mit DMSO

gelöst und in beiden Ansätzen jeweils mit einer Endkonzentration von 10 μM im jeweiligen Transportpuffer auf die Zellen gegeben. DHEAS wurde in beiden Lösungsmitteln vollständig gelöst, was durch eine optische Kontrolle unter dem Mikroskop verifiziert wurde.

Die Auswertung dieses Versuchs machte sehr deutlich, dass Cyclodextrin als Lösungsvermittler für Zelltransportexperimente ungeeignet ist, da durch seinen Einsatz die Transportaktivität stark gehemmt wird. Worin genau dieser Effekt begründet liegt, muss noch genauer geklärt werden.

Da kein anderes potentiell Lösungsmittel für CS zur Verfügung stand, wurde in den folgenden Ansätzen komplett auf die Kaltsubstanz verzichtet und die Transportaktivität von SOAT für CS allein mit der Heißsubstanz untersucht.

Die Ergebnisse dieses Ansatzes sprachen dafür, dass die Transportmessung allein mit der Heißsubstanz zwar im Grunde funktioniert, dass eine Transportaktivität von SOAT für CS unter den gewählten experimentellen Bedingungen allerdings nicht nachweisbar ist.

Um zu untersuchen, ob möglicherweise ein anderer Transporter für Steroidmoleküle in der Lage ist in dem gewählten Transport-Assay CS zu transportieren, wurden entsprechende Transportexperimente mit den in HEK293 Zellen transient transfizierten Transportern NTCP, ASBT, OATP2B1, OATP1B3, OATP1B2 und OAT4 durchgeführt. Jedoch ließ sich auch für keinen dieser Carrier eine Transportaktivität für CS nachweisen.

Um eine mögliche Interaktion von CS mit den Zellen bzw. mit den Transportproteinen deutlicher zu machen, wurden die Zellen vor der Messung mit CS-Kaltsubstanz in Medium vor inkubiert. Obwohl sich CS im Medium nicht vollständig löst, kann davon ausgegangen werden, dass trotzdem eine ausreichend große Menge CS für die Ausbildung eines Equilibriums zwischen Intra- und Extrazellularraum in Lösung vorliegt. Dieses Experiment wurde sowohl über 24 h, als auch nur mit 1 h Vorinkubationszeit durchgeführt, um eine mögliche Zersetzung des CS durch Desulfonierung über den langen Zeitraum von 24 h auszuschließen. In beiden Fällen zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen den vorinkubierten Zellen und den nicht vorinkubierten Kontrollen. Darüber hinaus ließ sich auch in diesen Ansätzen keine Transportaktivität von SOAT/Soat für CS darstellen.

Als Resultat aller Messungen muss davon ausgegangen werden, dass SOAT/Soat keine Transportaktivität für CS besitzt oder diese unter den vielfältigen eingesetzten experimentellen Bedingungen nicht in der Zellkultur darstellbar ist.

CS Aufnahme

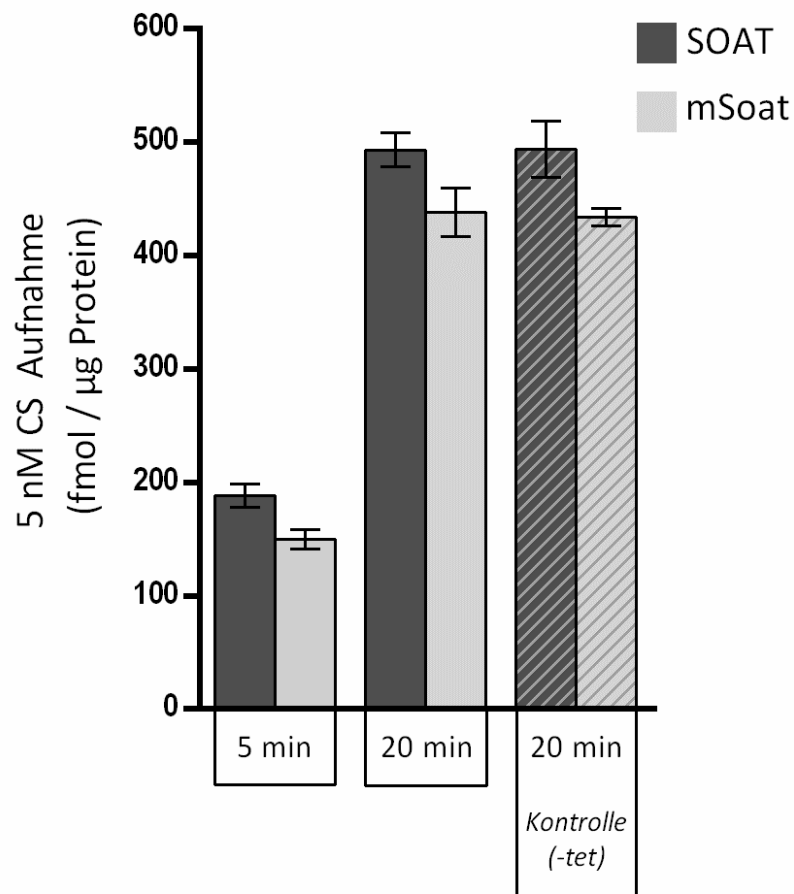


Abb. 3: Cholesterin-Sulfat (CS) Aufnahme in HEK293 T-Rex SOAT/mSoat Zellen (repräsentatives Beispiel)

3×10^5 stabil transfizierte HEK293 T-Rex SOAT- bzw. mSoat- Zellen wurden pro Well einer 24-Well Zellkulturschale ausgesät und mit Tetracyclin (tet) induziert. Die Kultivierung der Zellen fand in D-MEM / F12-Medium (Gibco), ergänzt mit 10% fetalem Kälberserum (Sigma), L-Glutamin (4 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Feuchtigkeit, statt. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, enthaltend 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 7,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4, 37°C) gewaschen, bevor die Zellen für 10 min mit Transportpuffer (142,9 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,8 mM CaCl₂ und 20 mM HEPES, pH 7,4, 37°C) vorinkubiert wurden. Zur Kontrolle wurden alle Transportexperimente auch mit nicht-induzierten Zellen durchgeführt. Die Transportstudien wurden mit jeweils 250 µl Transportpuffer, einschließlich 5 nM [³H]CS, für 5 min bzw. 20 min bei 37°C durchgeführt. Die Aufnahme wurde durch Entfernen des Transportpuffers und fünf Waschschrte mit eiskaltem PBS beendet. Danach wurden die Zellen in 1 N NaOH mit 0,1% SDS lysiert und die zellassoziierte Radioaktivität wurde durch Flüssigszintillationszählung gemessen. Zur Normalisierung der Transportdaten wurde der Protein-Gehalt mittels BCA Protein Assay Kit (Novagen) berechnet.

3.6.2. OXYSTEROLE

Oxysterole wirken im Organismus als physiologische Regulatoren, die in Verbindung mit vielen Cholesterin-induzierten metabolischen Effekten stehen [Bjorkhem, 2009; Bjorkhem et al., 2009]. Sie sind endogene Derivate des Cholesterins, die die Fähigkeit besitzen, Zellmembranen und die Blut-Hirn-Schranke schneller zu passieren als das Cholesterin selbst. Damit sind sie unter anderem als Transportformen des Cholesterins wichtig.

Zu den freien Hydroxycholesterolen gehören das 24S-, das 25- und das 27-Hydroxycholesterol (24OHC, 25OHC bzw. 27OHC) [Sanchez-Guijo et al., 2015b]. 24OHC und 27OHC sind dabei die am häufigsten vorkommenden Oxysterole im Organismus [Acimovic et al., 2013]. Das 27OHC ist ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM) und ein *liver x receptor* (LXR)-Agonist, der unter anderem verschiedene Funktionen im Knochen und im kardiovaskulären System ausübt [Umetani et al., 2007; DuSell und McDonnell, 2008; DuSell et al., 2008; DuSell et al., 2010; Nelson et al., 2011]. Darüber hinaus fanden Nelson et al. im Jahr 2013 heraus, dass 27OHC einen proliferativen Effekt auf das Tumorzellwachstum beim malignen Brustkrebs hat.

Etwa 10% des 24OHC bzw. des 27OHC liegen im menschlichen Plasma als sulfokonjugierte Formen vor [Peet et al., 1998]. Diese sogenannten Hydroxycholesterol-Sulfate sind strukturell mit CS verwandte Moleküle, die allerdings eine zusätzliche Hydroxylgruppe aufweisen.

Sánchez-Guijo et al. fanden heraus, dass CS nicht das einzige sulfokonjugierte Steroid ist, das bei Patienten mit RXLI erhöht ist. Auch für verschiedene Oxysterol-Sulfate konnten mittels LC-MS/MS erhöhte Spiegel festgestellt werden. Außerdem konnte erstmals bewiesen werden, dass der Fund von Hydroxysterol-Sulfaten keine Folge von Probenhandhabung oder Probenvorbereitung ist, sondern ihre Herkunft und ihr Auftreten in den Messungen enzymatisch bedingt sind [Sánchez-Guijo et al., 2015b].

Es gibt zwei mögliche Wege, über die Oxysterol-Sulfate im Körper gebildet werden können. Sobald die Oxysterole aus Cholesterin synthetisiert wurden, können sie durch die Sulfotransferase (SULT) sulfokonjugiert werden [Javitt et al., 2001]. Außerdem können die Oxysterol-Sulfate enzymatisch direkt aus CS gebildet werden [Norlin et al., 2003].

Da die Oxysterole, sowie auch die Oxysterol-Sulfate, auf Grund ihrer zusätzlichen Hydroxylgruppe bessere Transportsubstrate sein sollten als CS wäre denkbar, dass SOAT/Soat Hydroxycholesterin-

Sulfate transportieren kann. In diesem Falle könnte der erhöhte CS-Plasmaspiegel der männlichen *Slc10a6* Knockout Mäuse erklärt werden, welcher das Resultat eines „Rückstaus“ nicht transportierten Oxysterols darstellen könnte.

Bezüglich der Fragestellung, ob neben den erhöhten CS Werten im Serum auch erhöhte Werte für verschiedene Oxysterole nachweisbar sind, könnte in nachfolgenden Untersuchungen das Serum männlicher und weiblicher *Slc10a6* Knockout Mäuse, im Vergleich zum Wildtyp, mittels LC-MS/MS analysiert werden. Außerdem könnten in Zelltransportexperimenten in Kombination mit LC-MS/MS eine mögliche Transportaktivität von SOAT/Soat für verschiedene Hydroxycholesterin-Sulfate untersucht werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Der *sodium-dependent organic anion transporter* SOAT/Soat (Genname *SLC10A6* Mensch und *Slc10a6* Tier) ist ein hochspezifischer Aufnahme-Transporter für sulfokonjugierte Steroidhormone, welche eine große strukturelle Ähnlichkeit untereinander aufweisen. SOAT-Substrate sind durch ein planares, lipophiles Steroid-Gerüst mit einer Ring-Konformation in *trans-trans-trans*-Stellung gekennzeichnet. Außerdem weisen sie eine negativ geladene Monosulfat-Gruppe an den Positionen C3 oder C17 auf, die sowohl in α -, als auch in β -Konstellation auftreten kann. Strukturell gesehen spielt es also keine Rolle auf welcher Seite des Moleküls die SO_4^{2-} -Gruppe angehängt ist. Darüber hinaus sind 5α -Reduktion, sowie 16α - und 17α -Hydroxylierung für die Substraterkennung von SOAT akzeptabel, während das Vorhandensein einer zweiten, negativ geladenen Sulfatgruppe den Substrattransport verhindert.

SOAT zeigt im Menschen eine prädominante Expression im Hoden und wird in der Maus vor allem in Lunge, Haut und Hoden exprimiert. In beiden Spezies wurde das Protein besonders in Spermatozyten und Spermatozoen detektiert, was darauf schließen lässt, dass SOAT/Soat im Hoden von Maus und Mensch die gleiche Funktion einnimmt. Darüber hinaus wurde eine signifikante Reduktion der SOAT-mRNA-Expression bei verschiedenen Störungen der Spermatogenese im Menschen gefunden. Aus diesen Gründen könnte SOAT/Soat eine Rolle für die lokale Versorgung mit Steroiden im Hoden spielen und damit auch einen Einfluss auf die männliche Fruchtbarkeit nehmen.

Um der Aufklärung der physiologischen Funktionen des SOAT/Soat in Bezug auf Fruchtbarkeit und Spermatogenese näher zu kommen wurden zwei Strategien verfolgt: Neben der Analyse funktionell relevanter, genetischer Varianten von SOAT, die mit einer gestörten Spermatogenese korreliert sein könnten, wurde ein *Slc10a6*-Knockout-Maus-Modell etabliert, um Physiologie und Pathophysiologie des Transporters in Bezug auf Reproduktionsverhalten, Fertilität und Samenqualität *in vivo* zu evaluieren.

Unter den 31 analysierten SOAT-Varianten zeigten nur zwei eine erhaltene Transportaktivität für [^3H]DHEAS. Alle anderen SOAT-Varianten weisen hingegen einen verminderten Substrat-Transport auf. Einige dieser funktionsbeeinträchtigten Varianten zeigten darüber hinaus eine signifikant reduzierte Expression in der Plasmamembran, während andere Varianten an oder in direkter Nachbarschaft zu den mutmaßlichen Natrium-Bindungsstellen lokalisiert sind. Eine verminderte

Expression in der Plasmamembran kann einen negativen Effekt auf die Transportrate haben, während ein beeinträchtigter Transport nicht notwendigerweise die Plasmamembranexpression beeinflusst. Die Varianten, die in unmittelbarer Nähe zu oder direkt an den Natrium-Bindungsstellen lokalisiert sind, beeinflussen die SOAT-Transportaktivität wahrscheinlich, indem sie Na^+ von seiner Bindung an den jeweiligen Bindungsstellen abhalten und somit auch den Natrium-abhängigen Transport der Substrate verhindern.

Die *Slc10a6*^{-/-}-Knockout-Mäuse sind fruchtbar, produzieren normale Wurfgrößen und zeigen eine normale Spermatogenese und Spermivitalität. Möglicherweise kann der Verlust der Soat-Expression in den Knockout-Mäusen kompensiert werden, da der Knockout konstitutiv ist und nicht erst konditionell verursacht wird. Außerdem ist denkbar, dass die Soat-Funktion trotz allem kein wesentlicher Bestandteil des Reproduktionsgeschehens ist. Zusätzlich zur reproduktiven Phänotypisierung wurde eine Steroidanalyse mit 9 unkonjugierten und 12 sulfokonjugierten Steroiden im Serum von *Slc10a6*^{-/-}-Knockout- und *Slc10a6*^{+/+}-Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Im Zuge dessen wurden in den männlichen *Slc10a6*^{-/-}-Knockout-Mäusen, im Vergleich zum Wildtyp, signifikant höhere Serumspiegel für Cholesterin-Sulfat nachgewiesen. Dies könnte möglicherweise eine Bedeutung für die Haut haben, welche auf eine Ansammlung von CS mit einer Ichthyose reagiert.

5. SUMMARY

The sodium-dependent organic anion transporter SOAT/Soat (gene *SLC10A6* in humans, *Slc10a6* in animals) is a highly specific uptake carrier for sulfo-conjugated steroid hormones, which show a high degree of structural similarity. SOAT substrates are characterized by a lipophilic steroid backbone with a *trans-trans-trans* conformation of the steroid rings. In addition, all SOAT substrates show a negatively charged mono-sulfate group at position C3 or C17, which can occur in both α - and β -conformation. Structurally, it does not matter on which side of the molecule the sulfate group is attached. In addition, 5 α -reduction, as well as 16 α - and 17 α -hydroxylation are acceptable for SOAT substrate recognition, while the presence of a second, negatively charged sulfate group seems to prevent substrate binding.

In humans, SOAT is predominantly expressed in the testes. In mice, Soat shows largest expression in lungs, skin and testes. In both species, the protein was detected particularly in spermatids and spermatocytes, suggesting that SOAT/Soat fulfills a similar function in the testes of both humans and mice. In addition, a significant reduction of SOAT mRNA expression has been found in various disorders of spermatogenesis in humans. For these reasons, SOAT/Soat could play a role in the local supply of steroids in the testes and thus could have an effect on male fertility. In addition to analyzing functionally relevant genetic variants of SOAT that might be correlated with disturbed spermatogenesis, an *Slc10a6* knockout mouse-model was established to evaluate the transporter's physiology and pathophysiology in terms of reproduction, fertility and semen quality *in vivo*.

Among the 31 SOAT variants analyzed, only two showed preserved transport activity for [³H]DHEAS. All other SOAT variants, however, were functionally impaired. In addition, some of these loss-of-function variants showed significantly reduced plasma membrane expression, while others are located directly at or adjacent to the putative sodium binding sites. Decreased expression in the plasma membrane may have a negative effect on the transport rate, whereas impaired transport does not necessarily affect plasma membrane expression. The variants, which are located in close proximity to or directly at the sodium binding sites, probably influence the SOAT transport activity by preventing Na⁺ from binding to the respective binding sites and thus also preventing the sodium-dependent transport of the substrates.

The *Slc10a6*^{-/-}-knockout mice do not show any visible aberrations. They are fertile, produce normal litter sizes and show normal spermatogenesis and sperm vitality. It is possible, that the loss of Soat expression can be compensated in the knockout mice, since the knockout is indeed constitutive and not caused conditionally. In addition, it is conceivable that notwithstanding, Soat function is not an essential part of the reproduction process. In addition to reproductive phenotyping, steroid analysis was performed with 9 unconjugated and 12 sulfoconjugated steroids in the serum of *Slc10a6*^{-/-}-knockout and *Slc10a6*^{+/+}-wild type mice. As a result, in the male *Slc10a6*^{-/-}-knockout mice significantly higher serum cholesterol sulfate levels were detected, in comparison to the wild type.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abe, T., et al. (1999), Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1, *J Biol Chem*, 274(24), 17159-17163.

Abe, T., et al. (2001), LST-2, A human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers, *Gastroenterology*, 120(7), 1689-1699, doi: 10.1053/gast.2001.24804.

AbuAli, G., and S. Grimm (2014), Isolation and characterization of the anticancer gene organic cation transporter like-3 (ORCTL3), *Adv Exp Med Biol*, 818, 213-227, doi: 10.1007/978-1-4471-6458-6_11.

Acimovic, J., et al. (2013), Sulphatation does not appear to be a protective mechanism to prevent oxysterol accumulation in humans and mice, *PLoS One*, 8(7), e68031, doi: 10.1371/journal.pone.0068031.

Adachi, H., et al. (2003), Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D, *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(6), F1188-1197, doi: 10.1152/ajprenal.00402.2002.

Al Sarakbi, W., R. Mokbel, M. Salhab, W. G. Jiang, M. J. Reed, and K. Mokbel (2006), The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer, *Anticancer Res*, 26(6C), 4985-4990.

Alhadeff, R., A. Ganoth, and I. T. Arkin (2015), Mechanistic studies of the apical sodium-dependent bile acid transporter, *Proteins*, 83(6), 1107-1117, doi: 10.1002/prot.24796.

Allen, W. M. (1941), The Chemical and Physiological Properties, and Clinical Uses of the Corpus Luteum Hormone, Progesterone, *Bull N Y Acad Med*, 17(7), 508-518.

Alperin, E. S., and L. J. Shapiro (1997), Characterization of point mutations in patients with X-linked ichthyosis. Effects on the structure and function of the steroid sulfatase protein, *J Biol Chem*, 272(33), 20756-20763.

Amann, R. P., and D. Waberski (2014), Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments, *Theriogenology*, 81(1), 5-17 e11-13, doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004.

Bahn, A., Y. Hagos, S. Reuter, D. Balen, H. Brzica, W. Krick, B. C. Burckhardt, I. Sabolic, and G. Burckhardt (2008), Identification of a new urate and high affinity nicotinate transporter, hOAT10 (*SLC22A13*), *J Biol Chem*, 283(24), 16332-16341, doi: 10.1074/jbc.M800737200.

- Bakhaus, K., D. Fietz, S. Kliesch, W. Weidner, M. Bergmann, and J. Geyer (2018a), The polymorphism L204F affects transport and membrane expression of the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*), *J Steroid Biochem Mol Biol*, 179, 36-44, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.017.
- Bakhaus, K., et al. (2018b), Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 179, 45-54, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.07.019.
- Baulieu, E. E. (1997), Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system, *Recent Prog Horm Res*, 52, 1-32.
- Beato, M. (1989), Gene regulation by steroid hormones, *Cell*, 56(3), 335-344.
- Bergmann, M. (2005), [Spermatogenesis--physiology and pathophysiology], *Urologe A*, 44(10), 1131-1132, 1134-1138, doi: 10.1007/s00120-005-0909-2.
- Bergmann, M., D. Nashan, and E. Nieschlag (1989), Pattern of compartmentation in human seminiferous tubules showing dislocation of spermatogonia, *Cell Tissue Res*, 256(1), 183-190.
- Bergmann, M., H. M. Behre, and E. Nieschlag (1994), Serum FSH and testicular morphology in male infertility, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 40(1), 133-136.
- Bergner, E. A., and L. J. Shapiro (1981), Increased cholesterol sulfate in plasma and red blood cell membranes of steroid sulfatase deficient patients, *J Clin Endocrinol Metab*, 53(1), 221-223, doi: 10.1210/jcem-53-1-220.
- Bijsmans, I. T., R. A. Bouwmeester, J. Geyer, K. N. Faber, and S. F. van de Graaf (2012), Homo- and hetero-dimeric architecture of the human liver Na(+)-dependent taurocholate co-transporting protein, *Biochem J*, 441(3), 1007-1015, doi: 10.1042/BJ20111234.
- Bjorkhem, I. (2009), Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo?, *J Lipid Res*, 50 Suppl, S213-218, doi: 10.1194/jlr.R800025-JLR200.
- Bjorkhem, I., A. Cedazo-Minguez, V. Leoni, and S. Meaney (2009), Oxysterols and neurodegenerative diseases, *Mol Aspects Med*, 30(3), 171-179, doi: 10.1016/j.mam.2009.02.001.
- Burck, P. J., and R. E. Zimmerman (1980), The inhibition of acrosin by sterol sulphates, *J Reprod Fertil*, 58(1), 121-125.
- Burckhardt, B. C., and G. Burckhardt (2003), Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubule cells, *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 146, 95-158, doi: 10.1007/s10254-002-0003-8.
- Burger, H. G. (2002), Androgen production in women, *Fertil Steril*, 77 Suppl 4, 3-5, doi: 10.1016/S0015-0282(02)02985-0.

- Carette, D., K. Weider, J. Gilleron, S. Giese, J. Dompierre, M. Bergmann, R. Brehm, J. P. Denizot, D. Segretain, and G. Pointis (2010), Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility, *Dev Biol*, 346(1), 54-67, doi: 10.1016/j.ydbio.2010.07.014.
- Cha, S. H., T. Sekine, H. Kusuvara, E. Yu, J. Y. Kim, D. K. Kim, Y. Sugiyama, Y. Kanai, and H. Endou (2000), Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta, *J Biol Chem*, 275(6), 4507-4512.
- Chen, J. J., Z. Li, H. Pan, D. L. Murphy, H. Tamir, H. Koepsell, and M. D. Gershon (2001), Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters, *J Neurosci*, 21(16), 6348-6361.
- Chetrite, G. S., J. Cortes-Prieto, J. C. Philippe, F. Wright, and J. R. Pasqualini (2000), Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 72(1-2), 23-27.
- Clermont, Y. (1966), Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population, *Fertil Steril*, 17(6), 705-721.
- Clermont, Y., and B. Perey (1957), Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats, *Am J Anat*, 100(2), 241-267, doi: 10.1002/aja.1001000205.
- Cole, S. P. (2014), Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a "multitasking" ATP-binding cassette (ABC) transporter, *J Biol Chem*, 289(45), 30880-30888, doi: 10.1074/jbc.R114.609248.
- Collins, F. S., L. D. Brooks, and A. Chakravarti (1998), A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation, *Genome Res*, 8(12), 1229-1231.
- Conley, A. J., and I. M. Bird (1997), The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals, *Biol Reprod*, 56(4), 789-799.
- Cooke, H. J., and P. T. Saunders (2002), Mouse models of male infertility, *Nat Rev Genet*, 3(10), 790-801, doi: 10.1038/nrg911.
- Cooper, T. G., Noonan, E., von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, G. H.W., Behre, H. M., Haugen, T. B., Kruger, T., Wang, C., Mbizvo, M. T., Vogelsong, K. M. (2010): World Health Organization reference values for human semen characteristics
In: *Human Reproduction Update*, Volume 16, Issue 3, Oxford Academic, 231–245.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048>
- Cuevas-Covarrubias, S. A., M. A. Juarez-Oropeza, R. Miranda-Zamora, and J. C. Diaz-Zagoya (1993), Comparative analysis of human steroid sulfatase activity in prepubertal and postpubertal males and females, *Biochem Mol Biol Int*, 30(4), 691-695.

- Cui, Y., J. König, I. Leier, U. Buchholz, and D. Keppler (2001), Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter *SLC21A6*, *J Biol Chem*, 276(13), 9626-9630, doi: 10.1074/jbc.M004968200.
- Cutler, G. B., Jr., M. Glenn, M. Bush, G. D. Hodgen, C. E. Graham, and D. L. Loriaux (1978), Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates, *Endocrinology*, 103(6), 2112-2118, doi: 10.1210/endo-103-6-2112.
- Day, J. M., A. Purohit, H. J. Tutill, P. A. Foster, L. W. Woo, B. V. Potter, and M. J. Reed (2009), The development of steroid sulfatase inhibitors for hormone-dependent cancer therapy, *Ann N Y Acad Sci*, 1155, 80-87, doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03677.x.
- Deeley, R. G., and S. P. Cole (1997), Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP), *Semin Cancer Biol*, 8(3), 193-204, doi: 10.1006/scbi.1997.0070.
- Denning, M. F., M. G. Kazanietz, P. M. Blumberg, and S. H. Yuspa (1995), Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes, *Cell Growth Differ*, 6(12), 1619-1626.
- Doldi, N., M. Bassan, V. Bonzi, and A. Ferrari (1996), Effects of growth hormone and growth hormone-releasing hormone on steroid synthesis in cultured human luteinizing granulosa cells, *Gynecol Endocrinol*, 10(2), 101-108.
- Döring, B. (2009), Molekulare und funktionelle Charakterisierung des humanen Natrium-dependent organic anion transporter (SOAT). Dissertationsschrift am Institut für Biochemie der Ernährung, Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen, VVB Laufersweiler Verlag, Gießen, ISBN 978-3-8359-5592-9
- Döring, B., Lütteke, T., Geyer, J., Petzinger, E. (2012), The *SLC10* Carrier Family: Transport Functions and Molecular Structure
In: *Current Topics in Membranes*, Volume 70, München: Elsevier, 105-168
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394316-3.00004-1>
- Drew, D., and O. Boudker (2016), Shared Molecular Mechanisms of Membrane Transporters, *Annu Rev Biochem*, 85, 543-572, doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014520.
- Duffel, H. W. (2010), Sulfotransferases, Reference Module in Biomedical Sciences
In: McQueen, C.A. (Hrsg.): *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*, Volume 10, 2018, 407-428.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00418-8>
- DuSell, C. D., and D. P. McDonnell (2008), 27-Hydroxycholesterol: a potential endogenous regulator of estrogen receptor signaling, *Trends Pharmacol Sci*, 29(10), 510-514, doi: 10.1016/j.tips.2008.07.003.

- DuSell, C. D., M. Umetani, P. W. Shaul, D. J. Mangelsdorf, and D. P. McDonnell (2008), 27-hydroxycholesterol is an endogenous selective estrogen receptor modulator, *Mol Endocrinol*, 22(1), 65-77, doi: 10.1210/me.2007-0383.
- DuSell, C. D., E. R. Nelson, X. Wang, J. Abdo, U. I. Modder, M. Umetani, D. Gesty-Palmer, N. B. Javitt, S. Khosla, and D. P. McDonnell (2010), The endogenous selective estrogen receptor modulator 27-hydroxycholesterol is a negative regulator of bone homeostasis, *Endocrinology*, 151(8), 3675-3685, doi: 10.1210/en.2010-0080.
- Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum, and G. P. Vinson (1998), Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis, *Endocr Rev*, 19(2), 101-143, doi: 10.1210/edrv.19.2.0326.
- Elias, P. M., M. L. Williams, M. E. Maloney, J. A. Bonifas, B. E. Brown, S. Grayson, and E. H. Epstein, Jr. (1984), Stratum corneum lipids in disorders of cornification. Steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive X-linked ichthyosis, *J Clin Invest*, 74(4), 1414-1421, doi: 10.1172/JCI111552.
- Emami Riedmaier, A., A. T. Nies, E. Schaeffeler, and M. Schwab (2012), Organic anion transporters and their implications in pharmacotherapy, *Pharmacol Rev*, 64(3), 421-449, doi: 10.1124/pr.111.004614.
- Epstein, E. H., J. M. Bonifas, T. C. Barber, and M. Haynes (1984), Cholesterol Sulfotransferase of Newborn Mouse Epidermis, *Journal of Investigative Dermatology*, 83(5), 332-335, doi: 10.1111/1523-1747.ep12264131.
- Epstein, E. H., Jr., R. M. Krauss, and C. H. Shackleton (1981), X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein, *Science*, 214(4521), 659-660.
- Farr, S. A., W. A. Banks, K. Uezu, F. S. Gaskin, and J. E. Morley (2004), DHEAS improves learning and memory in aged SAMP8 mice but not in diabetic mice, *Life Sci*, 75(23), 2775-2785, doi: 10.1016/j.lfs.2004.05.026.
- Ferlin, A., F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccarello, G. Palka, and C. Foresta (2007), Male infertility: role of genetic background, *Reprod Biomed Online*, 14(6), 734-745.
- Fietz, D., et al. (2013), Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis--cellular localization, expression pattern and functional analysis, *PLoS One*, 8(5), e62638, doi: 10.1371/journal.pone.0062638.
- Flood, J. F., and E. Roberts (1988), Dehydroepiandrosterone sulfate improves memory in aging mice, *Brain Res*, 448(1), 178-181.
- Flood, J. F., G. E. Smith, and E. Roberts (1988), Dehydroepiandrosterone and its sulfate enhance memory retention in mice, *Brain Res*, 447(2), 269-278.

- Fluck, C. E., W. L. Miller, and R. J. Auchus (2003), The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway, *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8), 3762-3766, doi: 10.1210/jc.2003-030143.
- Fuda, H., C. Shimizu, Y. C. Lee, H. Akita, and C. A. Strott (2002), Characterization and expression of human bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate synthase isoforms, *Biochem J*, 365(Pt 2), 497-504, doi: 10.1042/BJ20020044.
- Galuska, C. E., M. F. Hartmann, A. Sanchez-Guijo, K. Bakhaus, J. Geyer, G. Schuler, K. P. Zimmer, and S. A. Wudy (2013), Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS), *Analyst*, 138(13), 3792-3801, doi: 10.1039/c3an36817c.
- Gerber, J., J. Heinrich, and R. Brehm (2016), Blood-testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice, *Reproduction*, 151(2), R15-27, doi: 10.1530/REP-15-0366.
- Geyer, J., J. R. Godoy, and E. Petzinger (2004), Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland, *Biochem Biophys Res Commun*, 316(2), 300-306, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.02.048.
- Geyer, J., T. Wilke, and E. Petzinger (2006), The solute carrier family *SLC10*: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 372(6), 413-431, doi: 10.1007/s00210-006-0043-8.
- Geyer, J., B. Doring, K. Meerkamp, B. Ugele, N. Bakhiya, C. F. Fernandes, J. R. Godoy, H. Glatt, and E. Petzinger (2007), Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (*SLC10A6*), *J Biol Chem*, 282(27), 19728-19741, doi: 10.1074/jbc.M702663200.
- Geyer, J., et al. (2017), The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 172, 207-221, doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.07.002.
- Goettsch, S., R. A. Badea, J. W. Mueller, C. Wotzlaw, B. Schoelermann, L. Schulz, M. Rabiller, P. Bayer, and C. Hartmann-Fatu (2006), Human TPST1 transmembrane domain triggers enzyme dimerisation and localisation to the Golgi compartment, *J Mol Biol*, 361(3), 436-449, doi: 10.1016/j.jmb.2006.06.023.
- Gonzalez, F., D. A. Hatala, and L. Speroff (1991), Adrenal and ovarian steroid hormone responses to gonadotropin-releasing hormone agonist treatment in polycystic ovary syndrome, *Am J Obstet Gynecol*, 165(3), 535-545.
- Grosser, G., K. H. Baringhaus, B. Doring, W. Kramer, E. Petzinger, and J. Geyer (2016), Identification of novel inhibitors of the steroid sulfate carrier 'sodium-dependent organic anion transporter' SOAT (*SLC10A6*) by pharmacophore modelling, *Mol Cell Endocrinol*, 428, 133-141, doi: 10.1016/j.mce.2016.03.028.

- Grosser, G., J. Bennien, A. Sanchez-Guijo, K. Bakhaus, B. Doring, M. Hartmann, S. A. Wudy, and J. Geyer (2018), Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*), *J Steroid Biochem Mol Biol*, 179, 20-25, doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.013.
- Grosser, G., D. Fietz, S. Gunther, K. Bakhaus, H. Schweigmann, B. Ugele, R. Brehm, E. Petzinger, M. Bergmann, and J. Geyer (2013), Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (*Slc10a6*), *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138, 90-99, doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.03.009.
- Grube, M., K. Kock, S. Karner, S. Reuther, C. A. Ritter, G. Jedlitschky, and H. K. Kroemer (2006), Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones, *Mol Pharmacol*, 70(5), 1735-1741, doi: 10.1124/mol.106.026450.
- Hagenbuch, B., and P. J. Meier (2003), The superfamily of organic anion transporting polypeptides, *Biochim Biophys Acta*, 1609(1), 1-18.
- Hagenbuch, B., and P. J. Meier (2004), Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties, *Pflugers Arch*, 447(5), 653-665, doi: 10.1007/s00424-003-1168-y.
- Häggström, M., and D. Richfield (2014), Diagram of the pathways of human steroidogenesis, *WikiJournal of Medicine*, 1(1), doi: 10.15347/wjm/2014.005.
- Hamada, A., et al. (2008), Effect of *SLCO1B3* haplotype on testosterone transport and clinical outcome in caucasian patients with androgen-independent prostatic cancer, *Clin Cancer Res*, 14(11), 3312-3318, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4118.
- Hartmann, K., J. Bennien, B. Wapelhorst, K. Bakhaus, V. Schumacher, S. Kliesch, W. Weidner, M. Bergmann, J. Geyer, and D. Fietz (2016), Current insights into the sulfatase pathway in human testis and cultured Sertoli cells, *Histochem Cell Biol*, 146(6), 737-748, doi: 10.1007/s00418-016-1503-y.
- Heasley, B. (2012), Chemical synthesis of the cardiotoxic steroid glycosides and related natural products, *Chemistry*, 18(11), 3092-3120, doi: 10.1002/chem.201103733.
- Heckert, L., and M. D. Griswold (1993), Expression of the FSH receptor in the testis, *Recent Prog Horm Res*, 48, 61-77.
- Heller, C. G., and Y. Clermont (1963), Spermatogenesis in man: an estimate of its duration, *Science*, 140(3563), 184-186.
- Hemmerich, S., D. Verdugo, and V. L. Rath (2004), Strategies for drug discovery by targeting sulfation pathways, *Drug Discovery Today*, 9(22), 967-975, doi: 10.1016/s1359-6446(04)03261-1.

- Hernandez-Martin, A., R. Gonzalez-Sarmiento, and P. De Unamuno (1999), X-linked ichthyosis: an update, *Br J Dermatol*, 141(4), 617-627, doi: 10.1046/j.1365-2133.1999.03098.x.
- Hess, R. A. (2003), Estrogen in the adult male reproductive tract: a review, *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 52, doi: 10.1186/1477-7827-1-52.
- Hill, M., et al. (2010a), Steroid metabolome in plasma from the umbilical artery, umbilical vein, maternal cubital vein and in amniotic fluid in normal and preterm labor, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 121(3-5), 594-610, doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.10.012.
- Hill, M., et al. (2010b), Steroid metabolome in fetal and maternal body fluids in human late pregnancy, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 122(4), 114-132, doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.05.007.
- Hirano, M., K. Maeda, Y. Shitara, and Y. Sugiyama (2004), Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans, *J Pharmacol Exp Ther*, 311(1), 139-146, doi: 10.1124/jpet.104.068056.
- Hirano, M., K. Maeda, Y. Shitara, and Y. Sugiyama (2006), Drug-drug interaction between pitavastatin and various drugs via OATP1B1, *Drug Metab Dispos*, 34(7), 1229-1236, doi: 10.1124/dmd.106.009290.
- Hobkirk, R. (1993), Steroid sulfation Current concepts, *Trends Endocrinol Metab*, 4(2), 69-74.
- Hochberg, R. B., S. Ladany, and S. Lieberman (1974a), Cholesterol sulfate: some aspects of its biosynthesis and uptake by tissues from blood, *Endocrinology*, 94(1), 207-213, doi: 10.1210/endo-94-1-207.
- Hochberg, R. B., S. Ladany, M. Welch, and S. Lieberman (1974b), Cholesterol and cholesterol sulfate as substrates for the adrenal side-chain cleavage enzyme, *Biochemistry*, 13(9), 1938-1945.
- Hsiang, B., Y. Zhu, Z. Wang, Y. Wu, V. Sasseville, W. P. Yang, and T. G. Kirchgessner (1999), A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters, *J Biol Chem*, 274(52), 37161-37168.
- Hu, N. J., S. Iwata, A. D. Cameron, and D. Drew (2011), Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT, *Nature*, 478(7369), 408-411, doi: 10.1038/nature10450.
- Huber, R. D., B. Gao, M. A. Sidler Pfandler, W. Zhang-Fu, S. Leuthold, B. Hagenbuch, G. Folkers, P. J. Meier, and B. Stieger (2007), Characterization of two splice variants of human organic anion transporting polypeptide 3A1 isolated from human brain, *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(2), C795-806, doi: 10.1152/ajpcell.00597.2005.
- Ikuta, T., K. Chida, O. Tajima, Y. Matsuura, M. Iwamori, Y. Ueda, K. Mizuno, S. Ohno, and T. Kuroki (1994), Cholesterol sulfate, a novel activator for the eta isoform of protein kinase C, *Cell Growth Differ*, 5(9), 943-947.

Iwamori, M., Y. Iwamori, and N. Ito (1999), Regulation of the activities of thrombin and plasmin by cholesterol sulfate as a physiological inhibitor in human plasma, *J Biochem*, 125(3), 594-601.

Jacquemin, E., B. Hagenbuch, B. Stieger, A. W. Wolkoff, and P. J. Meier (1994), Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), 133-137.

Javitt, N. B., Y. C. Lee, C. Shimizu, H. Fuda, and C. A. Strott (2001), Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression, *Endocrinology*, 142(7), 2978-2984, doi: 10.1210/endo.142.7.8244.

Jetten, A. M., M. A. George, C. Nervi, L. R. Boone, and J. I. Rearick (1989), Increased cholesterol sulfate and cholesterol sulfotransferase activity in relation to the multi-step process of differentiation in human epidermal keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 92(2), 203-209.

Kawabe, S., T. Ikuta, M. Ohba, K. Chida, E. Ueda, K. Yamanishi, and T. Kuroki (1998), Cholesterol sulfate activates transcription of transglutaminase 1 gene in normal human keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 111(6), 1098-1102, doi: 10.1046/j.1523-1747.1998.00441.x.

Kobayashi, Y., N. Ohshiro, R. Sakai, M. Ohbayashi, N. Kohyama, and T. Yamamoto (2005), Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [*SLC22A7*]), *J Pharm Pharmacol*, 57(5), 573-578, doi: 10.1211/0022357055966.

Koepsell, H. (2013), The *SLC22* family with transporters of organic cations, anions and zwitterions, *Mol Aspects Med*, 34(2-3), 413-435, doi: 10.1016/j.mam.2012.10.010.

Komatsuzaki, K., T. Kosaki, M. Hashino, T. Yanaihara, T. Nakayama, and H. Mori (1987), [Metabolism of pregnenolone sulfate in feto-placental unit], *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 39(7), 1095-1102.

Konig, J., Y. Cui, A. T. Nies, and D. Keppler (2000), Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide, *J Biol Chem*, 275(30), 23161-23168, doi: 10.1074/jbc.M001448200.

Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer (2001), Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes, *J Mol Biol*, 305(3), 567-580, doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.

Kullak-Ublick, G. A., B. Hagenbuch, B. Stieger, A. W. Wolkoff, and P. J. Meier (1994), Functional characterization of the basolateral rat liver organic anion transporting polypeptide, *Hepatology*, 20(2), 411-416.

Kullak-Ublick, G. A., B. Hagenbuch, B. Stieger, C. D. Scheingart, A. F. Hofmann, A. W. Wolkoff, and P. J. Meier (1995), Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver, *Gastroenterology*, 109(4), 1274-1282.

- Kullak-Ublick, G. A., M. G. Ismail, B. Stieger, L. Landmann, R. Huber, F. Pizzagalli, K. Fattinger, P. J. Meier, and B. Hagenbuch (2001), Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver, *Gastroenterology*, 120(2), 525-533, doi: 10.1053/gast.2001.21176.
- Kumar, P., S. Henikoff, and P. C. Ng (2009), Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm, *Nat Protoc*, 4(7), 1073-1081, doi: 10.1038/nprot.2009.86.
- Kurima, K., B. Singh, and N. B. Schwartz (1999), Genomic organization of the mouse and human genes encoding the ATP sulfurylase/adenosine 5'-phosphosulfate kinase isoform SK2, *J Biol Chem*, 274(47), 33306-33312.
- Kusuhara, H., T. Sekine, N. Utsunomiya-Tate, M. Tsuda, R. Kojima, S. H. Cha, Y. Sugiyama, Y. Kanai, and H. Endou (1999), Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain, *J Biol Chem*, 274(19), 13675-13680.
- Laatikainen, T., E. A. Laitinen, and R. Vihko (1971), Secretion of free and sulfate-conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of human chorionic gonadotropin, *J Clin Endocrinol Metab*, 32(1), 59-64, doi: 10.1210/jcem-32-1-59.
- Labrie, F. (1991), *Intracrinology*, *Mol Cell Endocrinol*, 78(3), C113-118.
- Labrie, F. (2015), All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 145, 133-138, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.06.001.
- Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, and J. Simard (2001), DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology, *Front Neuroendocrinol*, 22(3), 185-212, doi: 10.1006/frne.2001.0216.
- Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, G. Pelletier, and M. El-Alfy (2000), Intracrinology and the skin, *Horm Res*, 54(5-6), 218-229, doi: 10.1159/000053264.
- Labrie, F., V. Luu-The, C. Labrie, A. Belanger, J. Simard, S. X. Lin, and G. Pelletier (2003), Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone, *Endocr Rev*, 24(2), 152-182, doi: 10.1210/er.2001-0031.
- Lalumiere, G., G. Bleau, A. Chapdelaine, and K. D. Roberts (1976), Cholesteryl sulfate and sterol sulfatase in the human reproductive tract, *Steroids*, 27(2), 247-260.
- Lampe, M. A., M. L. Williams, and P. M. Elias (1983), Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation, *J Lipid Res*, 24(2), 131-140.

- Langlais, J., M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau, and K. D. Roberts (1981), Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7266-7270.
- Lee, W., H. Glaeser, L. H. Smith, R. L. Roberts, G. W. Moeckel, G. Gervasini, B. F. Leake, and R. B. Kim (2005), Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry, *J Biol Chem*, 280(10), 9610-9617, doi: 10.1074/jbc.M411092200.
- Li, L., P. J. Meier, and N. Ballatori (2000), Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione, *Mol Pharmacol*, 58(2), 335-340.
- Li, L., T. K. Lee, P. J. Meier, and N. Ballatori (1998), Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter, *J Biol Chem*, 273(26), 16184-16191.
- Lindsay, J., L. L. Wang, Y. Li, and S. F. Zhou (2008), Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases, *Curr Drug Metab*, 9(2), 99-105.
- Longcope, C. (1996), Dehydroepiandrosterone metabolism, *J Endocrinol*, 150 Suppl, S125-127.
- Luu-The, V. (2013), Assessment of steroidogenesis and steroidogenic enzyme functions, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 137, 176-182, doi: 10.1016/j.jsbmb.2013.05.017.
- Lykkesfeldt, G., H. Hoyer, H. H. Ibsen, and F. Brandrup (1985a), Steroid sulphatase deficiency disease, *Clin Genet*, 28(3), 231-237.
- Lykkesfeldt, G., J. Muller, N. E. Skakkebaek, E. Bruun, and A. E. Lykkesfeldt (1985b), Absence of testicular steroid sulphatase activity in a boy with recessive X-linked ichthyosis and testicular maldescent, *Eur J Pediatr*, 144(3), 273-274.
- Lykkesfeldt, G., P. Bennett, A. E. Lykkesfeldt, S. Micic, S. Moller, and B. Svenstrup (1985c), Abnormal androgen and oestrogen metabolism in men with steroid sulphatase deficiency and recessive X-linked ichthyosis, *Clin Endocrinol (Oxf)*, 23(4), 385-393.
- Lyle, S., D. H. Geller, K. Ng, J. Stanczak, J. Westley, and N. B. Schwartz (1994), Kinetic mechanism of adenosine 5'-phosphosulphate kinase from rat chondrosarcoma, *Biochem J*, 301 (Pt 2), 355-359.
- Maninger, N., O. M. Wolkowitz, V. I. Reus, E. S. Epel, and S. H. Mellon (2009), Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS), *Front Neuroendocrinol*, 30(1), 65-91, doi: 10.1016/j.yfrne.2008.11.002.
- Martin-du-Pan, R. C., and P. Bischof (1995), Increased follicle stimulating hormone in infertile men. Is increased plasma FSH always due to damaged germinal epithelium?, *Hum Reprod*, 10(8), 1940-1945.

- Mathur, R. S., S. Landgrebe, L. O. Moody, S. Powell, and H. O. Williamson (1980), Plasma steroid concentrations in maternal and umbilical circulation after spontaneous onset of labor, *J Clin Endocrinol Metab*, 51(6), 1235-1238, doi: 10.1210/jcem-51-6-1235.
- McNamara, K. M., and H. Sasano (2015), The intracrinology of breast cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 145, 172-178, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.04.004.
- McNamara, K. M., D. T. Harwood, U. Simanainen, K. A. Walters, M. Jimenez, and D. J. Handelsman (2010), Measurement of sex steroids in murine blood and reproductive tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 121(3-5), 611-618, doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.02.001.
- Menuel, S., J.-P. Joly, B. Courcot, J. Elysée, N.-E. Ghermani and A. Marsura (2007), Synthesis and inclusion ability of a bis- β -cyclodextrin pseudo-cryptand towards Busulfan anticancer agent, *Tetrahedron*, 63(7), 1706-1714, doi: 10.1016/j.tet.2006.10.070.
- Meyer zu Schwabedissen, H. E., R. G. Tirona, C. S. Yip, R. H. Ho, and R. B. Kim (2008), Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer, *Cancer Res*, 68(22), 9338-9347, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0265.
- Miller, W. L. (2007), Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter, *Biochim Biophys Acta*, 1771(6), 663-676, doi: 10.1016/j.bbalip.2007.02.012.
- Monte, J. C., M. A. Nagle, S. A. Eraly, and S. K. Nigam (2004), Identification of a novel murine organic anion transporter family member, OAT6, expressed in olfactory mucosa, *Biochem Biophys Res Commun*, 323(2), 429-436, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.112.
- Mouhadjer, N., M. Bedin, and G. Pointis (1989), Steroid sulfatase activity in homogenates, microsomes and purified Leydig cells from adult rat testis, *Reprod Nutr Dev*, 29(3), 277-282.
- Mueller, J. W., L. C. Gilligan, J. Idkowiak, W. Arlt, and P. A. Foster (2015), The Regulation of Steroid Action by Sulfation and Desulfation, *Endocr Rev*, 36(5), 526-563, doi: 10.1210/er.2015-1036.
- Negishi, M., L. G. Pedersen, E. Petrotchenko, S. Shevtsov, A. Gorokhov, Y. Kakuta, and L. C. Pedersen (2001), Structure and function of sulfotransferases, *Arch Biochem Biophys*, 390(2), 149-157, doi: 10.1006/abbi.2001.2368.
- Nelson, E. R., et al. (2011), The oxysterol, 27-hydroxycholesterol, links cholesterol metabolism to bone homeostasis through its actions on the estrogen and liver X receptors, *Endocrinology*, 152(12), 4691-4705, doi: 10.1210/en.2011-1298.
- Ng, P. C., J. G. Henikoff, and S. Henikoff (2000), PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. Predicted hydrophobic and transmembrane, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 16(9), 760-766.

- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne (1997), Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein engineering*, 10(1), 1-6.
- Nilsson, M. E., et al. (2015), Measurement of a Comprehensive Sex Steroid Profile in Rodent Serum by High-Sensitive Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Endocrinology*, 156(7), 2492-2502, doi: 10.1210/en.2014-1890.
- Nishiwaki, T., Y. Daigo, M. Tamari, Y. Fujii, and Y. Nakamura (1998), Molecular cloning, mapping, and characterization of two novel human genes, ORCTL3 and ORCTL4, bearing homology to organic-cation transporters, *Cytogenet Cell Genet*, 83(3-4), 251-255, doi: 10.1159/000015197.
- Niswender, G. D., J. L. Juengel, P. J. Silva, M. K. Rollyson, and E. W. McIntush (2000), Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum, *Physiol Rev*, 80(1), 1-29, doi: 10.1152/physrev.2000.80.1.1.
- Noe, B., B. Hagenbuch, B. Stieger, and P. J. Meier (1997), Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10346-10350.
- Norlin, M., S. von Bahr, I. Bjorkhem, and K. Wikvall (2003), On the substrate specificity of human CYP27A1: implications for bile acid and cholestanol formation, *J Lipid Res*, 44(8), 1515-1522, doi: 10.1194/jlr.M300047-JLR200.
- Nozawa, T., K. Imai, J. Nezu, A. Tsuji, and I. Tamai (2004a), Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human, *J Pharmacol Exp Ther*, 308(2), 438-445, doi: 10.1124/jpet.103.060194.
- Nozawa, T., H. Minami, S. Sugiura, A. Tsuji, and I. Tamai (2005), Role of organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C) in hepatic uptake of irinotecan and its active metabolite, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin: in vitro evidence and effect of single nucleotide polymorphisms, *Drug Metab Dispos*, 33(3), 434-439, doi: 10.1124/dmd.104.001909.
- Nozawa, T., S. Sugiura, M. Nakajima, A. Goto, T. Yokoi, J. Nezu, A. Tsuji, and I. Tamai (2004b), Involvement of organic anion transporting polypeptides in the transport of troglitazone sulfate: implications for understanding troglitazone hepatotoxicity, *Drug Metab Dispos*, 32(3), 291-294, doi: 10.1124/dmd.32.3.291.
- Obaidat, A., M. Roth, and B. Hagenbuch (2012), The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer, *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 52, 135-151, doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556.
- Oelkers, P., L. C. Kirby, J. E. Heubi, and P. A. Dawson (1997), Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (*SLC10A2*), *J Clin Invest*, 99(8), 1880-1887, doi: 10.1172/JCI119355.

- Orth, J. M., G. L. Gunsalus, and A. A. Lamperti (1988), Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development, *Endocrinology*, 122(3), 787-794, doi: 10.1210/endo-122-3-787.
- Pasqualini, J. R. (2005), Enzymes involved in the formation and transformation of steroid hormones in the fetal and placental compartments, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97(5), 401-415, doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.08.004.
- Pasqualini, J. R., and G. S. Chetrite (2005), Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93(2-5), 221-236, doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.02.007.
- Pasqualini, J. R., and G. S. Chetrite (2012), Hormonal enzymatic systems in normal and cancerous human breast: control, prognostic factors, and clinical applications, *Horm Mol Biol Clin Investig*, 9(1), 25-63, doi: 10.1515/hmbci-2012-0018.
- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, and E. L. Nestour (1996), Control and expression of oestrone sulphatase activities in human breast cancer, *J Endocrinol*, 150 Suppl, S99-105.
- Pasqualini, J. R., C. Gelly, B. L. Nguyen, and C. Vella (1989), Importance of estrogen sulfates in breast cancer, *J Steroid Biochem*, 34(1-6), 155-163.
- Payne, A. H., and R. B. Jaffe (1975), Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes, *J Clin Endocrinol Metab*, 40(1), 102-107, doi: 10.1210/jcem-40-1-102.
- Payne, A. H., R. B. Jaffe, and M. R. Abell (1971), Gonadal steroid sulfates and sulfatase. 3. Correlation of human testicular sulfatase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-isomerase, histologic structure and serum testosterone, *J Clin Endocrinol Metab*, 33(4), 582-591, doi: 10.1210/jcem-33-4-582.
- Payne, A. H., A. Kawano, and R. B. Jaffe (1973), Formation of dihydrotestosterone and other 5 alpha-reduced metabolites by isolated seminiferous tubules and suspension of interstitial cells in a human testis, *J Clin Endocrinol Metab*, 37(3), 448-453, doi: 10.1210/jcem-37-3-448.
- Peet, D. J., S. D. Turley, W. Ma, B. A. Janowski, J. M. Lobaccaro, R. E. Hammer, and D. J. Mangelsdorf (1998), Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha, *Cell*, 93(5), 693-704.
- Perkins, L. M., and A. H. Payne (1988), Quantification of P450_{scc}, P450(17) alpha, and iron sulfur protein reductase in Leydig cells and adrenals of inbred strains of mice, *Endocrinology*, 123(6), 2675-2682, doi: 10.1210/endo-123-6-2675.
- Pizzagalli, F., B. Hagenbuch, B. Stieger, U. Klenk, G. Folkers, and P. J. Meier (2002), Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter, *Mol Endocrinol*, 16(10), 2283-2296, doi: 10.1210/me.2001-0309.

Pizzagalli, F., Z. Varga, R. D. Huber, G. Folkers, P. J. Meier, and M. V. St-Pierre (2003), Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland, *J Clin Endocrinol Metab*, 88(8), 3902-3912, doi: 10.1210/jc.2003-030174.

Prince, F. P. (1984), Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis, *Anat Rec*, 209(2), 165-176, doi: 10.1002/ar.1092090204.

Ramensky, V., P. Bork, and S. Sunyaev (2002), Human non-synonymous SNPs: server and survey, *Nucleic Acids Res*, 30(17), 3894-3900.

Reed, M. J., A. Purohit, L. W. Woo, S. P. Newman, and B. V. Potter (2005), Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition, *Endocr Rev*, 26(2), 171-202, doi: 10.1210/er.2004-0003.

Reid, G., N. A. Wolff, F. M. Dautzenberg, and G. Burckhardt (1998), Cloning of a human renal p-aminohippurate transporter, hROAT1, *Kidney Blood Press Res*, 21(2-4), 233-237, doi: 10.1159/000025863.

Rizner, T. L. (2016), The Important Roles of Steroid Sulfatase and Sulfotransferases in Gynecological Diseases, *Front Pharmacol*, 7, 30, doi: 10.3389/fphar.2016.00030.

Rizwan, A. N., and G. Burckhardt (2007), Organic anion transporters of the *SLC22* family: biopharmaceutical, physiological, and pathological roles, *Pharm Res*, 24(3), 450-470, doi: 10.1007/s11095-006-9181-4.

Roberts, K. D. (1987), Sterol sulfates in the epididymis; synthesis and possible function in the reproductive process, *J Steroid Biochem*, 27(1-3), 337-341.

Roberts, K. D., L. Bandi, H. I. Calvin, W. D. Drucker, and S. Lieberman (1964), Evidence That Steroid Sulfates Serve as Biosynthetic Intermediates. Iv. Conversion of Cholesterol Sulfate in Vivo to Urinary C-19 and C-21 Steroidal Sulfates, *Biochemistry*, 3, 1983-1988.

Robillard, K. R., T. Hoque, and R. Bendayan (2012), Expression of ATP-binding cassette membrane transporters in rodent and human sertoli cells: relevance to the permeability of antiretroviral therapy at the blood-testis barrier, *J Pharmacol Exp Ther*, 340(1), 96-108, doi: 10.1124/jpet.111.186916.

Roth, M., A. Obaidat, and B. Hagenbuch (2012), OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the *SLCO* and *SLC22A* gene superfamilies, *Br J Pharmacol*, 165(5), 1260-1287, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x.

Ruder, H. J., L. Loriaux, and M. B. Lipsett (1972), Estrone sulfate: production rate and metabolism in man, *J Clin Invest*, 51(4), 1020-1033, doi: 10.1172/JCI106862.

- Ruiz-Cortés, Z. T. (2012), Gonadal Sex Steroids Production, Action and Interactions in mammals
In: Ostojic, S., (Hrsg.): Steroids - From Physiology to Clinical Medicine
Published by InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, 3-44,
doi: 10.5772/46119, ISBN: 978-953-51-0857-3.
- Ruokonen, A. (1978), Steroid metabolism in testis tissue: the metabolism of pregnenolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in human and boar testes in vitro, *J Steroid Biochem*, 9(10), 939-946.
- Ruokonen, A., T. Laatikainen, E. A. Laitinen, and R. Vihko (1972), Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue, *Biochemistry*, 11(8), 1411-1416.
- Russell, L. D., H. P. Ren, I. Sinha Hikim, W. Schulze, and A. P. Sinha Hikim (1990), A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell, *Am J Anat*, 188(1), 21-30, doi: 10.1002/aja.1001880104.
- Saez, J. M. (1994), Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation, *Endocr Rev*, 15(5), 574-626, doi: 10.1210/edrv-15-5-574.
- Samojlik, E., R. J. Santen, and T. J. Worgul (1982), Plasma estrone-sulfate: assessment of reduced estrogen production during treatment of metastatic breast carcinoma, *Steroids*, 39(5), 497-507.
- Sanchez-Guijo, A., M. F. Hartmann, and S. A. Wudy (2013), Introduction to gas chromatography-mass spectrometry, *Methods Mol Biol*, 1065, 27-44, doi: 10.1007/978-1-62703-616-0_3.
- Sanchez-Guijo, A., V. Oji, M. F. Hartmann, H. Traupe, and S. A. Wudy (2015a), Simultaneous quantification of cholesterol sulfate, androgen sulfates, and progestagen sulfates in human serum by LC-MS/MS, *J Lipid Res*, 56(9), 1843-1851, doi: 10.1194/jlr.D061499.
- Sanchez-Guijo, A., V. Oji, M. F. Hartmann, H. C. Schuppe, H. Traupe, and S. A. Wudy (2015b), High levels of oxysterol sulfates in serum of patients with steroid sulfatase deficiency, *J Lipid Res*, 56(2), 403-412, doi: 10.1194/jlr.M055608.
- Santner, S. J., P. D. Feil, and R. J. Santen (1984), In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway, *J Clin Endocrinol Metab*, 59(1), 29-33, doi: 10.1210/jcem-59-1-29.
- Satlin, L. M., V. Amin, and A. W. Wolkoff (1997), Organic anion transporting polypeptide mediates organic anion/HCO₃⁻ exchange, *J Biol Chem*, 272(42), 26340-26345.
- Sato, M., H. Mamada, N. Anzai, Y. Shirasaka, T. Nakanishi, and I. Tamai (2010), Renal secretion of uric acid by organic anion transporter 2 (OAT2/SLC22A7) in human, *Biol Pharm Bull*, 33(3), 498-503.

- Schmitt, J. P., Rousseau, G. G. (1979), Structure and conformation of glucocorticoids, *Monogr Endocrinol.*, 12:79-95.
- Schmitt, A., R. Mossner, A. Gossmann, I. G. Fischer, V. Gorboulev, D. L. Murphy, H. Koepsell, and K. P. Lesch (2003), Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice, *J Neurosci Res*, 71(5), 701-709, doi: 10.1002/jnr.10521.
- Schnabolk, G. W., G. L. Youngblood, and D. H. Sweet (2006), Transport of estrone sulfate by the novel organic anion transporter Oat6 (*Slc22a20*), *Am J Physiol Renal Physiol*, 291(2), F314-321, doi: 10.1152/ajprenal.00497.2005.
- Schumacher, M., R. Guennoun, P. Robel, and E. E. Baulieu (1997), Neurosteroids in the Hippocampus: Neuronal Plasticity and Memory, *Stress*, 2(1), 65-78.
- Schuster, V. L. (2002), Prostaglandin transport, *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 68-69, 633-647.
- Schweigmann, H., et al. (2014), Transport of the placental estriol precursor 16alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16alpha-OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 143, 259-265, doi: 10.1016/j.jsbmb.2014.03.013.
- Secky, L., M. Svoboda, L. Klameth, E. Bajna, G. Hamilton, R. Zeillinger, W. Jager, and T. Thalhammer (2013), The sulfatase pathway for estrogen formation: targets for the treatment and diagnosis of hormone-associated tumors, *J Drug Deliv*, 2013, 957605, doi: 10.1155/2013/957605.
- Sekine, T., S. H. Cha, and H. Endou (2000), The multispecific organic anion transporter (OAT) family, *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 440(3), 337-350, doi: 10.1007/s004240000297.
- Sekine, T., N. Watanabe, M. Hosoyamada, Y. Kanai, and H. Endou (1997), Expression cloning and characterization of a novel multispecific organic anion transporter, *J Biol Chem*, 272(30), 18526-18529.
- Selcer, K. W., H. Kabler, J. Sarap, Z. Xiao, and P. K. Li (2002), Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells, *Steroids*, 67(10), 821-826.
- Serizawa, S., T. Nagai, and Y. Sato (1987), Simplified method of determination of serum cholesterol sulfate by reverse phase thin-layer chromatography, *J Invest Dermatol*, 89(6), 580-587.
- Shackleton, C. H., and S. Reid (1989), Diagnosis of recessive X-linked ichthyosis: quantitative HPLC/mass spectrometric analysis of plasma for cholesterol sulfate, *Clin Chem*, 35(9), 1906-1910.
- Shi, X., S. Bai, A. C. Ford, R. D. Burk, E. Jacquemin, B. Hagenbuch, P. J. Meier, and A. W. Wolkoff (1995), Stable inducible expression of a functional rat liver organic anion transport protein in HeLa cells, *J Biol Chem*, 270(43), 25591-25595.

- Shin, H. J., N. Anzai, A. Enomoto, X. He, D. K. Kim, H. Endou, and Y. Kanai (2007), Novel liver-specific organic anion transporter OAT7 that operates the exchange of sulfate conjugates for short chain fatty acid butyrate, *Hepatology*, 45(4), 1046-1055, doi: 10.1002/hep.21596.
- Sigg, C. (1979), [Classification of tubular testicular atrophies in the diagnosis of sterility. Significance of the so-called "bunte Atrophie"], *Schweiz Med Wochenschr*, 109(35), 1284-1293.
- Silverthorn, Dee U. (2009), Fortpflanzung und Entwicklung
In: Silverthorn, Dee U. (Hrsg.): *Physiologie*, 4., aktualisierte Auflage
München: Pearson Education Deutschland GmbH
- Simons, S. S., Jr. (2008), What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions, *Bioessays*, 30(8), 744-756, doi: 10.1002/bies.20792.
- Simonson, G. D., A. C. Vincent, K. J. Roberg, Y. Huang, and V. Iwanij (1994), Molecular cloning and characterization of a novel liver-specific transport protein, *J Cell Sci*, 107 (Pt 4), 1065-1072.
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R. J., Chen, Z. S. (2012), Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance, *Chin J Cancer*, 31(2), 58-72, doi: 10.5732/cjc.011.10329
- Srimaroeng, C., J. L. Perry, and J. B. Pritchard (2008), Physiology, structure, and regulation of the cloned organic anion transporters, *Xenobiotica*, 38(7-8), 889-935, doi: 10.1080/00498250801927435.
- St-Pierre, M. V., B. Hagenbuch, B. Ugele, P. J. Meier, and T. Stallmach (2002), Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta, *J Clin Endocrinol Metab*, 87(4), 1856-1863, doi: 10.1210/jcem.87.4.8431.
- Stanway, S. J., P. Delavault, A. Purohit, L. W. Woo, C. Thuriel, B. V. Potter, and M. J. Reed (2007), Steroid sulfatase: a new target for the endocrine therapy of breast cancer, *Oncologist*, 12(4), 370-374, doi: 10.1634/theoncologist.12-4-370.
- Steckelbroeck, S., et al. (2004), Steroid sulfatase (STS) expression in the human temporal lobe: enzyme activity, mRNA expression and immunohistochemistry study, *J Neurochem*, 89(2), 403-417, doi: 10.1046/j.1471-4159.2004.02336.x.
- Steger, K. (2001), Spermatogenese und Spermatogenesestörungen, *Reproduktionsmedizin*, 17(3), 137-148, doi: 10.1007/s004440100254.
- Strott, C. A. (2002), Sulfonation and molecular action, *Endocr Rev*, 23(5), 703-732, doi: 10.1210/er.2001-0040.
- Strott, C. A., and Y. Higashi (2003), Cholesterol sulfate in human physiology: what's it all about? *J Lipid Res*, 44(7), 1268-1278, doi: 10.1194/jlr.R300005-JLR200.

Sun, W., R. R. Wu, P. D. van Poelje, and M. D. Erion (2001), Isolation of a family of organic anion transporters from human liver and kidney, *Biochem Biophys Res Commun*, 283(2), 417-422, doi: 10.1006/bbrc.2001.4774.

Suzuki, M., H. Ishida, Y. Shiotsu, T. Nakata, S. Akinaga, S. Takashima, T. Utsumi, T. Saeki, and N. Harada (2009), Expression level of enzymes related to in situ estrogen synthesis and clinicopathological parameters in breast cancer patients, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 113(3-5), 195-201, doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.12.008.

Suzuki, T., Y. Miki, Y. Nakamura, K. Ito, and H. Sasano (2011), Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas, *Mol Cell Endocrinol*, 340(2), 148-153, doi: 10.1016/j.mce.2010.11.001.

Tagawa, N., Y. Sugimoto, J. Yamada, and Y. Kobayashi (2006), Strain differences of neurosteroid levels in mouse brain, *Steroids*, 71(9), 776-784, doi: 10.1016/j.steroids.2006.05.008.

Tamai, I., T. Nozawa, M. Koshida, J. Nezu, Y. Sai, and A. Tsuji (2001), Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C, *Pharm Res*, 18(9), 1262-1269.

Tamai, I., J. Nezu, H. Uchino, Y. Sai, A. Oku, M. Shimane, and A. Tsuji (2000), Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family, *Biochem Biophys Res Commun*, 273(1), 251-260, doi: 10.1006/bbrc.2000.2922.

Thatiparti, T. R., A. J. Shoffstall, and H. A. von Recum (2010), Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics, *Biomaterials*, 31(8), 2335-2347, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.087.

The Nomenclature of Steroids (1989), INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY and INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)

<http://www.sbcs.qmul.ac.uk/iupac/steroid/>

World Wide Web version prepared by G. P. Moss, Department of Chemistry, Queen Mary University of London, Mile End Road, London, E1 4NS, UK

Toshimori, K., C. Ito, M. Maekawa, Y. Toyama, F. Suzuki-Toyota, and D. K. Saxena (2004), Impairment of spermatogenesis leading to infertility, *Anat Sci Int*, 79(3), 101-111, doi: 10.1111/j.1447-073x.2004.00076.x.

Träger, L. (1977), *Der Abbau der Steroidhormone*

In: Träger, L. (Hrsg.): *Steroidhormone: Biosynthese, Stoffwechsel, Wirkung*
Berlin, Heidelberg: Springer, 164-197.

- Ugele, B., A. Bahn, and M. Rex-Haffner (2008), Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 111(1-2), 1-6, doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.04.001.
- Ugele, B., M. V. St-Pierre, M. Pihusch, A. Bahn, and P. Hantschmann (2003), Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(2), E390-398, doi: 10.1152/ajpendo.00257.2002.
- Umetani, M., H. Domoto, A. K. Gormley, I. S. Yuhanna, C. L. Cummins, N. B. Javitt, K. S. Korach, P. W. Shaul, and D. J. Mangelsdorf (2007), 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen, *Nat Med*, 13(10), 1185-1192, doi: 10.1038/nm1641.
- Utsumi, T., N. Yoshimura, S. Takeuchi, M. Maruta, K. Maeda, and N. Harada (2000), Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73(3-4), 141-145.
- Uwai, Y., H. Ida, Y. Tsuji, T. Katsura, and K. Inui (2007), Renal transport of adefovir, cidofovir, and tenofovir by *SLC22A* family members (hOAT1, hOAT3, and hOCT2), *Pharm Res*, 24(4), 811-815, doi: 10.1007/s11095-006-9196-x.
- Walker, W. H. (2009), Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis, *Steroids*, 74(7), 602-607, doi: 10.1016/j.steroids.2008.11.017.
- Walters, H. C., A. L. Craddock, H. Fusegawa, M. C. Willingham, and P. A. Dawson (2000), Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(6), G1188-1200, doi: 10.1152/ajpgi.2000.279.6.G1188.
- Warren, J. C., and A. P. French (1965), Distribution of Steroid Sulfatase in Human Tissues, *J Clin Endocrinol Metab*, 25, 278-282, doi: 10.1210/jcem-25-2-278.
- Weng, Y., F. Xie, L. Xu, D. Zagorevski, D. C. Spink, and X. Ding (2010), Analysis of testosterone and dihydrotestosterone in mouse tissues by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Anal Biochem*, 402(2), 121-128, doi: 10.1016/j.ab.2010.03.034.
- Weyrauch, K. D., Smollich, A., Plendl, J. (2009), Geschlechtssystem (Organa genitalia)
In: Weyrauch, Smollich, Plendl (Hrsg.): *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*, 2. Auflage
Stuttgart: Enke, 100-117. ISBN: 978-3-8304-1083-6
- Williams, M. L., and P. M. Elias (1981), Stratum corneum lipids in disorders of cornification: increased cholesterol sulfate content of stratum corneum in recessive x-linked ichthyosis, *J Clin Invest*, 68(6), 1404-1410.
- Wlcek, K., M. Svoboda, T. Thalhammer, F. Sellner, G. Krupitza, and W. Jaeger (2008), Altered expression of organic anion transporter polypeptide (OATP) genes in human breast carcinoma, *Cancer Biol Ther*, 7(9), 1450-1455.

Wong, C. C., N. P. Botting, C. Orfila, N. Al-Maharik, and G. Williamson (2011), Flavonoid conjugates interact with organic anion transporters (OATs) and attenuate cytotoxicity of adefovir mediated by organic anion transporter 1 (OAT1/*SLC22A6*), *Biochem Pharmacol*, 81(7), 942-949, doi: 10.1016/j.bcp.2011.01.004.

Wood, P. M., L. W. Woo, M. P. Thomas, M. F. Mahon, A. Purohit, and B. V. Potter (2011), Aromatase and dual aromatase-steroid sulfatase inhibitors from the letrozole and vorozole templates, *ChemMedChem*, 6(8), 1423-1438, doi: 10.1002/cmdc.201100145.

Yamaguchi, H., M. Sugie, M. Okada, T. Mikkaichi, T. Toyohara, T. Abe, J. Goto, T. Hishinuma, M. Shimada, and N. Mano (2010), Transport of estrone 3-sulfate mediated by organic anion transporter OATP4C1: estrone 3-sulfate binds to the different recognition site for digoxin in OATP4C1, *Drug Metab Pharmacokinet*, 25(3), 314-317.

Yaman, O., E. Ozdiler, I. Seckiner, and O. Gogus (1999), Significance of serum FSH levels and testicular morphology in infertile males, *Int Urol Nephrol*, 31(4), 519-523.

Ye, S. J., L. Ying, S. Ghosh, L. R. de Franca, and L. D. Russell (1993), Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat, *Anat Rec*, 237(2), 187-198, doi: 10.1002/ar.1092370206.

Yoshizawa, I., K. Takanashi, K. Watanabe, T. Sato, H. Honjo, K. Tanaka, N. Sakuragi, and S. Fujimoto (1992), The physiological role of estradiol 17-sulfate during pregnancy, *J Steroid Biochem Mol Biol*, 41(3-8), 567-570.

Young, D. G., and P. F. Hall (1969), The side-chain cleavage of cholesterol and cholesterol sulfate by enzymes from bovine adrenocortical mitochondria, *Biochemistry*, 8(7), 2987-2997.

Zahner, D., U. Eckhardt, and E. Petzinger (2003), Transport of taurocholate by mutants of negatively charged amino acids, cysteines, and threonines of the rat liver sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide Ntcp, *Eur J Biochem*, 270(6), 1117-1127.

Zeelen, F.J. (1995), *Phytosteroids*

In: H. L. J. Makin, D.B. Gower, B. Kirk (Hrsg.): *Steroid Analysis*

Springer Science & Business Media, 621-647. Originally published by Chapman & Hall 1995

doi: 10.1007/978-94-017-3078-5, ISBN 978-94-017-3080-8

Zhang, H., and J. Henion (1999), Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology, *Anal Chem*, 71(18), 3955-3964.

Zhou, X., E. J. Levin, Y. Pan, J. G. McCoy, R. Sharma, B. Kloss, R. Bruni, M. Quick, and M. Zhou (2014), Structural basis of the alternating-access mechanism in a bile acid transporter, *Nature*, 505(7484), 569-573, doi: 10.1038/nature12811.

Ziegler, R. G., B. J. Fuhrman, S. C. Moore, and C. E. Matthews (2015), Epidemiologic studies of estrogen metabolism and breast cancer, *Steroids*, 99(Pt A), 67-75, doi: 10.1016/j.steroids.2015.02.015.

Zouboulis, C. C. (2000), Human skin: an independent peripheral endocrine organ, *Horm Res*, 54(5-6), 230-242, doi: 10.1159/000053265.

7. DANKSAGUNGEN

So eine Doktorarbeit zu begeben und zu verfassen ist ganz schön anstrengend. Doch wenn man die richtigen Leute kennt, die einen in so vielen kleinen, großen und noch größeren Wegpunkten unterstützen, wird alles viel, viel einfacher. Aus diesem Grund möchte ich danke an alle sagen, die auf ihre jeweilige Weise an diesem Projekt mitgewirkt haben. Ich schulde schrecklich vielen Menschen Dank – denjenigen, die für mich da waren, als ich sie brauchte, denjenigen, die mir Tee gebracht haben, denjenigen, die mich zur Weißglut aber auch auf gute Ideen gebracht haben. Es wäre töricht da jemanden herauszustellen, aber trotzdem....

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter Adelheid, die mich in allem, das mir im Laufe meines Lebens so einfällt, unterstützt, berät und liebevoll zur Seite steht. In diesem Zuge natürlich auch meinem Stiefvater Löwe. Vielen Dank für Deine Ideen, Deine Geduld und Deine Weisheit und vor Allem für das Wegbereiten des ein oder anderen Abenteurers!

Ebenfalls großer Dank geht an meinen Vater Joachim, der mich gelehrt hat den Dingen mit Bedacht und der richtigen Portion Skepsis zu begegnen und selbst bei Rückschlägen nie den Mut und die Zuversicht zu verlieren. Außerdem für seinen herzlichen und raubeinigen Humor, der mich durch viele Schwierigkeiten getragen hat.

Vielen Dank natürlich auch meinen Geschwistern Lara-Lena, Maximilian und Jakob, die alle so herrlich unterschiedlich sind, dass man immer jemanden findet, der einem genau das sagt, was man gerade braucht.

Vielen Dank meinem persönlichen Coach und, viel wichtiger, Freund Hendrik Will, der mich sowohl durch das zehnte und elfte Semester, als auch durch die Promotion begleitet hat. Es war bestimmt nicht immer einfach mich durch die Launen und Frustrationsperioden hindurch zu ertragen. Danke, dass Du mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehst! Und danke für jeden Moment der wunderbaren Zeit mit Dir.

Einen Riesendank all meinen Freunden! Hätte ich mich nicht das ein oder andere Mal gemeinsam über Doktorarbeiten und überhaupt das ganze Leben beschweren können um mich dann doch wieder an letzterem zu freuen, weil Freunde so eine famose Sache sind, hätte Hendrik mich bestimmt nicht behalten.

Mein herzlichster Dank gilt natürlich Prof. Dr. Joachim Geyer für dieses großartige Thema, die Hilfsbereitschaft und die zahlreichen, verständnisvollen Diskussionen. Bei jeglichen Schwierigkeiten konnte ich immer auf ein offenes Ohr und viel kreative Hilfe im Problemlösen zählen.

Nicht verzagen, Gary fragen! Ein ganz großes Dankeschön geht an eben diesen Dr. Gary Grosser, der mich nicht ein einziges Mal enttäuscht hat, wenn ich Hilfe brauchte. Obwohl man sagen muss, dass ich gar nicht in seinen Zuständigkeitsbereich fiel, hat er mich immer unterstützt und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen, vielen Dank für die Unterstützung und Hilfe von Dr. Katharina Bakhaus, auf deren Engagement und Ideen große Teile meiner Promotion fußen. Sie hat nicht nur SOAT geprägt, sondern auch mich und meine Arbeit am Institut.

Ein riesiger Dank geht auch an Dr. Thomas Fischer, den Fluoreszenzprofi und Scherzkeks, der zum Glück auch jetzt nur zwei Stockwerke entfernt ist und den ich deswegen immer wieder gerne konsultieren darf.

Ein großes Dankeschön geht an die Veterinäranatomie, -histologie und -embryologie, allen voran an Prof. Dr. Martin Bergmann und Dr. Daniela Fietz für die freundschaftliche und warmherzige Zusammenarbeit!

Ein ebenso großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Wudy und seine Arbeitsgruppe der Allgemeinen Pädiatrie und Neonatologie des UKGM, besonders an *el maravilloso* Dr. Alberto Sánchez-Guijo, der unermüdlich alle noch so verrückten LC-MS/MS –Wünsche möglich gemacht hat.

Dankeschön Prof. Dr. Melanie Hamann! Nicht nur für die vielen Tipps und wertvollen Ratschläge, sondern auch weil es immer lustig ist, sie in ihrem Büro zu besuchen. Egal wie staubtrocken die Frage ist, Melanie beantwortet sie mit einer professionellen Unterhaltsamkeit, die beneidenswert ist.

Vielen lieben Dank auch an Dr. Kornelia Ziegler, die einem stets frech und fröhlich zeigt wo es langgeht und mir die eine oder andere Lebensweisheit mit auf den Weg gegeben hat.

Herzlichen Dank, lieber Klaus Schuh! Deine Zellzauberei und stets ansteckende Fröhlichkeit hat mir alle noch so anstrengenden Tage viel leichter gemacht. Ich bin direkt traurig für die neuen Generationen an Doktoranden, die ohne Dich auskommen müssen.

Vielen Dank liebe Anita Neubauer! Die Expertise in Person und immer nen frechen Spruch auf den Lippen. Zum Glück gibt es Dich! Du hältst nicht nur das Labor in Stand, sondern auch unser Team am Laufen. Und manchmal am hektischen Rennen. Zu Recht. Danke für Dein Engagement was den wissenschaftlichen Nachwuchs angeht und für Deine große Hilfe in zahllosen Momenten.

Einen Riesendank liebe Regina Leidolf! Du weißt in jeder Lebenslage den richtigen Rat und wenn mal ein Experiment schief geht findest Du immer den Weg zur Lösung. Danke für Deine Genialität, Deine Hilfe zwischen den Irrungen und Wirrungen der Pharmtox und für Deine Freundschaft!

Liebe Bärbel Fühler, vielen Dank auch Dir! *Mother of mice*. Was hätte ich ohne Dich getan? Mit einer stoischen Ruhe und wie immer Du das auch machst, einer unnachahmbaren Grazie führst Du uns regelmäßig alle vor, wenn es darum geht Mäuse zu jonglieren. Hut ab! Und danke für Dein ansteckendes Lachen selbst im Angesicht der unangenehmsten Aufgaben.

Ein herzlicher Dank geht auch an Dr. Jörg Alber, dessen weiser Rat mich vor der ein oder anderen Katastrophen bewahrt hat. Außerdem: Es gibt niemanden, der Autoklaven so heroisch bezwingt wie Jörg!

Vielen Dank liebe Birgit Kauß! Der Tag hat gleich gut angefangen, wenn man dein freudiges „Guten Morgen!“ über den Flur hört. Danke, dass Du uns allen als gute Seele das Arbeiten im Labor so angenehm machst!

Simon Müller, der nichts will, außer dass die Welt weniger ätzend ist. Deine pedantische Großartigkeit wird mir hoffentlich noch lange erhalten bleiben. Vielen Dank für unzählige Ratschläge und noch mehr sinnvolle Diskussionen. Außerdem dafür, dass Du Dich einmischst, wenn man es braucht, auch wenn man das manchmal zu dem Zeitpunkt selber noch nicht weiß. Du hast immer einen Plan. Vielen Dank, dass Du auch oft einen für mich hattest. Es ist schön, dass wir so gute Freunde geworden sind.

Mein Matthias! Es gibt wohl nichts Schöneres, als vor einer großen Aufgabe zu stehen und zu wissen, dass man sie nicht allein begehen muss, weil man einen Freund hat, der nur ein paar Räume weiter sitzt, einem den Rücken stärkt und das Gefühl gibt alles schaffen zu können. Sogar Mathematik. Ich kann Dir hier unmöglich für alles danken. Deswegen jetzt nur für eins: Danke, dass Du für mich da bist.

Vielen Dank meiner Lieblingskollegin Dajana Gräfe. Wenn man sie anschaut glaubt man gar nicht was für ein großes Herz in diesem kleinen Körper steckt und welch frecher Humor. Außerdem kann man auch nicht glauben wie viel Tee in sie rein geht. Sie hat mir an zahlreichen Tagen die Hirnwindungen entknotet und sich mit mir aufgeregt, wenn ich mich aufregen wollte. Allein das hat schon ungemein zur Verbesserung dieser Arbeit beigetragen. Und so viel Anderes darüber hinaus. Danke!

Liebe Nina Bartzsch, danke für Dein offenes, erfrischendes Wesen und die Mittagsdiskussionen! Dank Grobi verstehe ich nun endlich, warum das Krümelmonster keinen Salat fressen darf, außer wenn es sich innerhalb eines genehmigten Tierversuchs befindet.

Dankeschön liebe Saskia Noppes. Von Deiner angenehm ruhigen Professionalität im Zeichen der zornigen Hefe kann man sich wirklich ein Stück abschneiden.

Für schlechte Witze, Shantys, herrliche Ausflüge ins Sauerland und den allgemeinen Eindruck die Dinge mit mehr Humor nehmen zu sollen, einen herzlichen Dank an Maria Wüst! Du bist spitze.

Liebe Kira Orth, vielen Dank für die zahlreichen lustigen Diskussionen, Katzenbilder und die gemeinsame Meisterung des manchmal zu physikalischen Alltags.

Dem einzig wahren Matthias (Gorecki) ein herzliches Dankeschön für seinen Mut. Er bezwang nicht nur Doktoranden, Transwells und hohe Bäume, er trotzte sogar mit heiterer Finesse den manchmal harten Bedingungen im Underdoc-Büro.

Ein sehr fröhliches Dankeschön geht auch an Massimo Palatini, Michael Kirstgen und Daniela Gäns. Es ist kaum zu glauben, aber durch Euch ist unser Pharmtox-Alltag tatsächlich noch witziger und skurriler geworden. Danke, dass ich mich jeden Tag beömmeln muss.

Zu Guter Letzt geht ein besonderes Dankeschön an Jörn Wickhorst und Mazen Alsahen. Wann immer wir uns im Flur oder im Sozialraum begegnet sind wurden Geschichten ausgetauscht, Pläne geschmiedet und schöne Momente verbracht. Danke für das Erhellen all dieser Tage!

8. ANHANG

PUBLIKATION #1

Grosser, G., Bennien, J., Sánchez-Guijo, A., Bakhaus, K., Döring, B., Hartmann, M., Wudy, S.A., Geyer, J. (2018):

„Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*)“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 20-25

doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.013

(Authors in bold equally contributed)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Transport of steroid 3-sulfates and steroid 17-sulfates by the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6)



Gary Grosser^{a,1}, Josefine Bennien^{a,1}, Alberto Sánchez-Guijo^b, Katharina Bakhaus^a, Barbara Döring^a, Michaela Hartmann^b, Stefan A. Wudy^b, Joachim Geyer^{a,*}

^a Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany

^b Steroid Research and Mass Spectrometry Unit, Pediatric Endocrinology and Diabetology, Center of Child and Adolescent Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

SOAT
SLC10A6
Transport
Sulfated steroids
17β-Estradiol-17-sulfate
17β-Estradiol-3,17-disulfate
Epiandrosterone sulfate

ABSTRACT

The sodium-dependent organic anion transporter SOAT/Soat shows highly specific transport activity for sulfated steroids. SOAT substrates identified so far include dehydroepiandrosterone sulfate, 16α-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate, estrone-3-sulfate, pregnenolone sulfate, 17β-estradiol-3-sulfate, and androstenediol sulfate. Apart from these compounds, many other sulfated steroids occur in mammals. Therefore, we aimed to expand the substrate spectrum of SOAT and analyzed the SOAT-mediated transport of eight different sulfated steroids by combining *in vitro* transport experiments in SOAT-transfected HEK293 cells with LC–MS/MS analytics of cell lysates. In addition, we aimed to better understand the structural requirements for SOAT substrates and so selected structural pairs varying only at specific positions: 3α/3β-sulfate, 17α/17β-sulfate, mono-sulfate/di-sulfate, and 17α-hydroxylation. We found significant and sodium-dependent SOAT-mediated transport of 17α-hydroxypregnenolone sulfate, 17β-estradiol-17-sulfate, androsterone sulfate, epiandrosterone sulfate, testosterone sulfate, epitestosterone sulfate, and 5α-dihydrotestosterone sulfate. However, 17β-estradiol-3,17-disulfate was not transported by SOAT.

In conclusion: SOAT substrates from the group of sulfated steroids are characterized by a planar and lipophilic steroid backbone in *trans-trans-trans* conformation of the rings and a negatively charged mono-sulfate group at positions 3' or 17' with flexibility for α- or β- orientation. Furthermore, 5α-reduction, 16α-hydroxylation, and 17α-hydroxylation are acceptable for SOAT substrate recognition, whereas addition of a second negatively charged sulfate group seems to abolish substrate binding to SOAT, and so 17β-estradiol-3,17-disulfate is not transported by SOAT.

1. Introduction

In 2004, we cloned a novel member of the Solute Carrier Family SLC10 from rat adrenal gland and named it sodium-dependent organic anion transporter (Soat) [1]. Although other members of this carrier family are typical bile acids transporters, being Na⁺/taurocholate co-transporting polypeptide (Ntcp) and apical sodium-dependent bile acid transporter (Asbt), Soat showed no transport activity for bile acids [2]. However, when expressed in *Xenopus laevis* oocytes, Soat revealed significant sodium-dependent uptake of estrone-3-sulfate (E₁S) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) [1]. Later, the human SOAT

transcript (gene name *SLC10A6*) was cloned and functionally characterized in stably SOAT-transfected HEK293 cells [3]. The human and rat SOAT/Soat proteins exhibit about 70% amino acid sequence identity. Human SOAT showed transport activity for E₁S, DHEAS and pregnenolone sulfate (PregS) with K_m values of 12 μM, 29 μM, and 11 μM, respectively [3]. Apart from these compounds, it was supposed that SOAT can transport further sulfated steroid molecules [4]. However, E₁S, DHEAS, and PregS are the only sulfated steroids, which are commercially available in a radiolabeled form and, therefore, are the only common test substrates from the group of sulfated steroids for *in vitro* transport studies [2,5]. To overcome this limitation, we combined

Abbreviations: AnDiolS, androstenediol sulfate; AnS, androsterone sulfate; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; 16α-OH-DHEAS, 16α-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate; DHTS, 5α-dihydrotestosterone sulfate; epiAnS, epiandrosterone sulfate; eTS, epitestosterone sulfate; E₁S, estrone-3-sulfate; E₂-3S, 17β-estradiol-3-sulfate; E₂-17S, 17β-estradiol-17-sulfate; E₂-diS, 17β-estradiol-3,17-disulfate; IS, internal standard; LC, liquid chromatography; LOQ, limit of quantification; MS, mass spectrometry; PBS, phosphate-buffered saline; PregS, pregnenolone sulfate; 17α-OH-PregS, 17-hydroxypregnenolone sulfate; SOAT, sodium-dependent organic anion transporter; TS, testosterone sulfate

* Corresponding author at: Institute of Pharmacology and Toxicology, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Schubertstr. 81, 35392 Giessen, Germany.

E-mail address: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de (J. Geyer).

¹ Equally contributed.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.013>

Received 30 May 2017; Received in revised form 15 September 2017; Accepted 21 September 2017

Available online 23 September 2017

0960-0760/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

our *in vitro* transport experiments with LC–MS/MS analytics, which enabled us to analyze the transport of different sulfated steroid molecules from cell lysates with highest specificity [6,7]. Using LC–MS/MS, SOAT-mediated transport of 17 β -estradiol-3-sulfate (E₂-3S), androstenediol sulfate (AnDiolS), and 16 α -hydroxydehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) was demonstrated in previous studies [8,9].

In the present study, we aimed to further specify the structural requirements of a sulfated steroid to be transported by SOAT and to expand the SOAT substrate spectrum. We analyzed if different modifications at the sulfated steroid molecule are accepted for SOAT transport. These included the number and localization of sulfate group/s at the C3 and/or C17 positions [E₂-3S vs. 17 β -estradiol-17-sulfate (E₂-17S) vs. 17 β -estradiol-3,17-disulfate (E₂-diS)], as well as their orientations in C3 α (androsterone sulfate, AnS), C3 β (epiandrosterone sulfate, epiAnS), C17 α (epitestosterone sulfate, eTS), or C17 β (testosterone sulfate, TS). In addition, 17 α -OH-PregS and 5 α -dihydrotestosterone sulfate (DHTS) were included to analyze further modifications at the steroid molecule. To the best of our knowledge, this is the first experimental study on the carrier-mediated transport of the mentioned steroid sulfates at all. We found SOAT-mediated transport of all tested 3'- and 17'-mono-sulfated steroids, but interestingly SOAT-mediated transport of E₂-diS could not be demonstrated.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All of the chemicals, unless otherwise stated, were from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). AnS, E₂-17S, and epiAnS were from Makaira Ltd. (London, UK). TS and 17 α -OH-PregS were purchased from Steraloids Inc. (Newport, USA). DHTS and eTS were from NATA (Sydney, Australia). [³H]Dehydroepiandrosterone sulfate ([³H]DHEAS, 60 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Waltham, USA).

2.2. Transport and inhibition studies in stably transfected HEK293 cells

For the transport studies we used tetracycline-inducible stably SOAT-transfected HEK293 cells as reported before [3]. The cells were cultivated in D-MEM/F12 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, L-glutamine (4 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity. For experimental use, 24-well plates were coated with poly-L-lysine for better attachment of the cells. Per well 1.25 \times 10⁵ cells were seeded and cultured with standard medium for 72 h containing tetracycline (1 μ g/ml) to induce SOAT expression. Cells without the gene of interest were used as negative control. All transport studies were performed in the presence and absence of sodium. In the sodium-free transport buffer, sodium chloride was replaced by equimolar concentrations of choline chloride. Before starting the transport experiments, cells were washed three times with the respective transport buffer (142.9 mM NaCl or 142.9 mM choline chloride, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, and 20 mM HEPES, adjusted to pH 7.4 with KOH, 37 °C). Transport studies were performed by incubating the cells with 300 μ l transport buffer containing the respective sulfated steroid for 10 min at 37 °C. Uptake studies were stopped by removing the transport buffer and washing the cells 5-times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 7.3 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Afterwards, cells were lysed by adding 400 μ l demineralized H₂O to the cell monolayer followed by four freeze-thaw cycles. Aliquots of the cell lysates were subjected to LC–MS/MS analytics as described below. Additionally, the protein content was determined using the BCA protein assay kit from Novagen. Inhibition studies were performed in the same way as the transport studies with the following modifications. Sodium-dependent uptake of [³H]DHEAS was measured in the presence of other inhibitory sulfated

steroids with concentrations of 25 μ M and 250 μ M. Cells were seeded in 12-well plates and grown to confluence. Inhibition experiments were started by pre-incubation with the respective inhibitor at 37 °C for 30 s. Subsequently, [³H]DHEAS was added, and the incubation was continued for 5 min at 37 °C. Uptake was terminated by removing the transport buffer and washing with ice-cold PBS. Cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting and the protein content was determined as described before [3].

2.3. Mass spectrometric determination of sulfated steroids

All reference steroids and the internal standards (ISs) were purchased from C/D/N Isotopes Inc. (Pointe-Claire, Canada), Sigma-Aldrich, Steraloids Inc., or from LGC Standards (Teddington, UK). All sulfated steroids were analyzed by LC–MS/MS methods developed by our group and described in detail before [6,7]. LC–MS/MS equipment consisted of an HPLC system (Agilent 1200SL, Waldbronn, Germany) hyphenated with a triple quadrupole mass spectrometer (TSQ, Quantum Ultra, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany). The columns for liquid chromatography were either Hypersil GOLD (50 \times 2.1 mm, 5 μ m) [6] or Accucore Phenyl-X (100 \times 2.1 mm, 2.6 μ m) [7], both from Thermo Fisher Scientific. MS/MS quantification was performed by negative electrospray ionization.

PregS, E₂-3S and E₂-17S were analyzed by the method of Galuska et al. [6], whereas 17 α -OH-PregS, AnS, epiAnS, DHTS, epiTS and TS were quantified following the method of Sánchez-Guijo et al. [7]. The analysis of E₂-17S was performed with the transition m/z 351 \rightarrow 97 (collision energy of 37 eV and a tube lens voltage of 167 V). The IS for E₂-17S was d₄E₂-3S. Good linearity was found for a range between 1 and 250 ng/ml. Chromatograms of E₂-17S and its IS are shown in Fig. 1A.

Concerning sample preparation, dilution of the cell lysates was followed by centrifugation. Dilution was usually 3:5 (v/v) and achieved by pipetting 60 μ l of the cell lysate into centrifuge tubes containing the IS and a mix of solvents to a final volume of 100 μ l. The final composition in volume was 79.75% water, 10% methanol, 10% acetonitrile, and 0.25% ammonium hydroxide (see [7]) or 89.95% water, 10% methanol and 0.05% ammonium hydroxide (see [6]). Calibration curves were obtained with dilutions of the pure standards. The standard of the commercial sulfated steroid (with different concentrations for each calibration point) was mixed with the IS and 60 μ l of cell lysate free of steroids to a final volume of 100 μ l. The percentage of solvents was identical for samples and calibrators. Finally, samples and calibrators were centrifuged (14.500g, 5 min, at room temperature), taken into vials with glass inserts and injected in the LC–MS/MS system (10 μ l).

A new LC method was required for the analysis of E₂-diS, due to its high polarity. The column was a C30 Accucore column (50 \times 4.6 mm, 2.6 μ m) from Thermo Fisher Scientific. Solvents were buffer solution A with ammonium acetate [20 mM (pH 7) dissolved in 50% water and 50% acetonitrile] and solution B with 100% acetonitrile. The flow was 200 μ l/min. The gradient started with a 50% of B during 150 s, followed by a 99% B during 60 s (ramp gradient), 30 s 99% of B, and re-equilibration during 90 s to reach 50% B (ramp gradient). Total method duration was 5.5 min. Retention times were 1.95 min for E₂-diS and 2.15 min for its IS d₄E₁S (Fig. 1B). MS conditions were as reported before [6]. Under these conditions, the precursor ion [M-2H]²⁻, m/z 215, generated two most abundant product ions: m/z 175 and m/z 80. The transition m/z 215 \rightarrow 175 was used for quantification of E₂-diS (collision energy of 19 eV and tube lens voltage of 84 V). The ion m/z 97 was less abundant, in coincidence with a recent report [10]. Sample preparation consisted of the dilution of 120 μ l of cell lysate sample with 80 μ l of acetonitrile containing the IS, followed by centrifugation. The supernatant was transferred to glass conical vials. Calibrators were prepared with cell lysate free of steroids, following the same sample preparation. Next, 20 μ l of each sample were injected into the HPLC

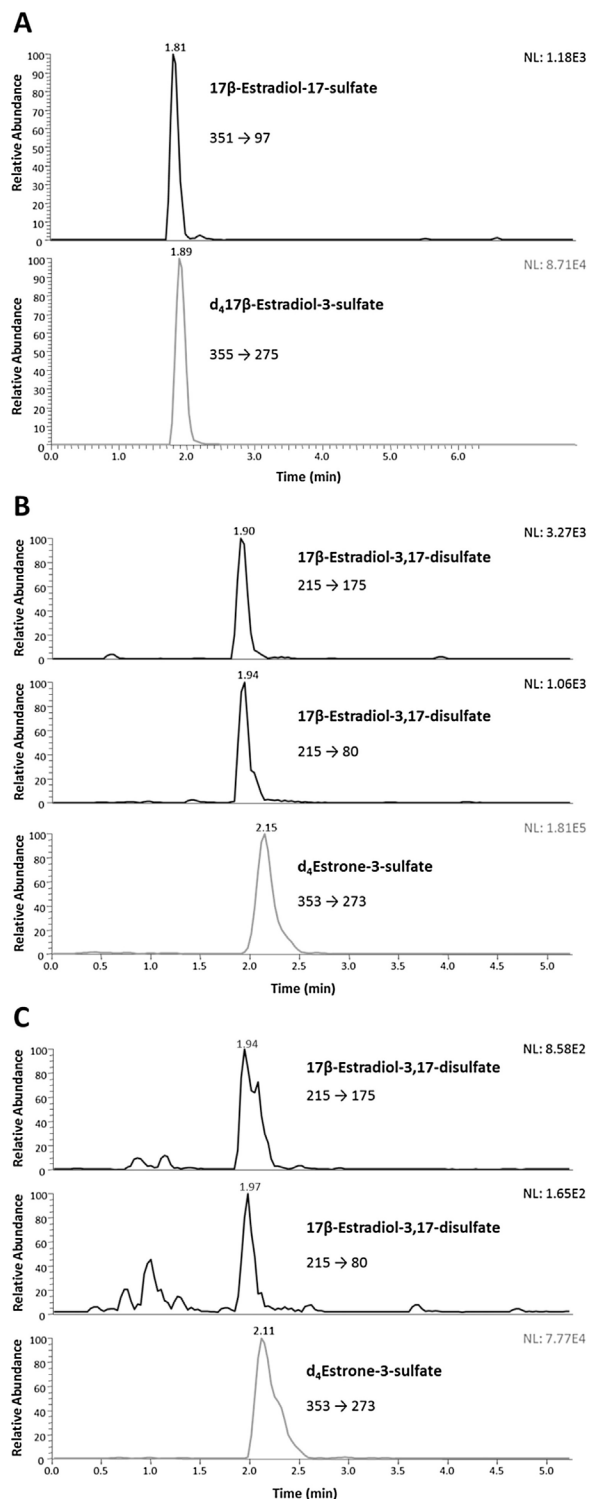


Fig. 1. Representative LC-MS/MS chromatograms of E₂-17S, E₂-diS and their respective internal standards.

(A) Chromatograms of E₂-17S from a cell lysate sample (concentration 28.3 ng/ml). (B) Chromatograms of E₂-diS from a standard with concentration 2.5 ng/ml. (C) Chromatograms of E₂-diS from a cell lysate sample at concentration below 1 ng/ml.

system. The method was linear between 1 and 100 ng/ml.

2.4. Statistical analysis

For statistical data analysis GraphPad Prism software (Version 6.05, GraphPad Software, La Jolla, USA) was used. For comparison of the

transport data one-way ANOVA or unpaired *t*-test was applied as indicated in the figure legends. Data with *p* < 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

Apart from being SOAT substrates, PregS, E₁S, DHEAS, and E₂-3S are supposed to be competitive inhibitors of SOAT [3,8,11]. Indeed, at concentrations of 25 μM and 250 μM all these compounds were able to significantly inhibit the [³H]DHEAS uptake by SOAT, with PregS being the most potent inhibitor (Fig. 2). Additionally, E₂-17S and E₂-diS inhibited the [³H]DHEAS transport by SOAT in a concentration-dependent manner, with E₂-17S being even more potent than E₂-3S. In contrast, estrone-3-glucuronide, which is not transported by SOAT [3], showed only weak inhibition of the [³H]DHEAS transport by SOAT, even at 100-fold molar excess of the inhibitor (Fig. 2). Based on these data it was suggested that apart from the steroid 3-sulfates also 17-sulfates and 3,17-disulfates might be substrates of SOAT. However, as neither E₂-17S nor E₂-diS are commercially available in a radiolabeled form, these experiments cannot be easily performed. Apart from the question, if 17-sulfates and 3,17-disulfates are transported by SOAT at all, we also aimed to understand if the orientation of the sulfate group (in α or β position) is relevant for substrate recognition by SOAT.

Therefore, we planned a more sophisticated study by combining transport experiments in stably transfected SOAT-HEK293 cells with LC-MS/MS analytics, which enabled us to analyze the transport of different sulfated steroids, independent from the availability as radiolabeled tracers [6,7]. In these experiments, several sulfated steroids were incubated with the SOAT-HEK293 cells and the test compounds then were quantified from the cell lysates. Here, LC-MS/MS allows the highest specificity in steroid analysis and is able to determine intact steroid sulfates from cell lysates [4]. This method was validated in a previous study, in which a mixture of E₁S, DHEAS, and PregS (10 μM each) was incubated on NTCP-HEK293 cells and all compounds were quantified from the cell lysates in a single LC-MS/MS run at concentrations of 12.9 ng/ml, 10.0 ng/ml, and 222.5 ng/ml, respectively [6].

In further studies, using the same LC-MS/MS technique, SOAT-mediated transport of E₁S, DHEAS, E₂-3S, AnDiolS, and 16α-OH-DHEAS was demonstrated [8,9]. Later, the spectrum was expanded to simultaneously quantify 11 different intact sulfated steroids by LC-MS/MS [7], also including 17-OH-PregS, AnS, epiAnS, TS, epiTS, and DHTS, investigated in the present study. Another advantage of this experimental approach is that the transport of intact sulfated steroid molecules from the extracellular to the intracellular compartment is measured without co-analyzing de-conjugated or even otherwise modified steroids as it can be the case when using radiolabeled compounds [4,6,8]. In all transport experiments, two different negative controls were included. SOAT-HEK293 cells were incubated with either sodium-containing or sodium-free transport buffer (sodium-free control) and all experiments were additionally performed in HEK293 cells without gene of interest (control cells).

As reported before [3,11], SOAT showed significant sodium-dependent transport of PregS, here with 6-fold higher values under sodium conditions compared to sodium-free conditions (Fig. 3A). In addition, 17α-OH-PregS was identified as novel SOAT substrate and was only detected in SOAT-HEK293 cells under sodium-conditions, but was below the limit of quantification (LOQ) in the sodium-free control and in the control cells. Due to this fact, no transport ratio could be determined for 17α-OH-PregS. In comparison with PregS, the additional polar hydroxy group at position 17' seemed to generally derogate membrane permeability, but most likely is not relevant for substrate recognition by SOAT.

Three different 17β-estradiol sulfates were analyzed for transport by SOAT: E₂-3S, E₂-17S, and E₂-diS (Fig. 3B), from which E₂-3S was an already known substrate of SOAT [8]. As for the latter two compounds

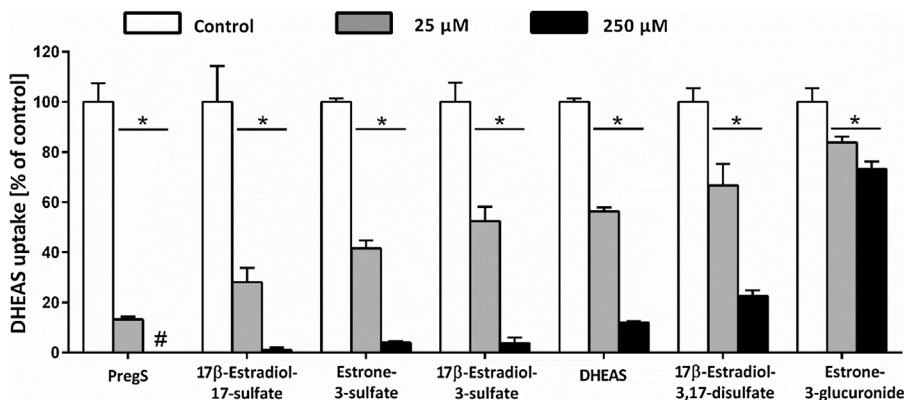


Fig. 2. SOAT-mediated [^3H]DHEAS transport is inhibited by different other conjugated steroids.

Sodium-dependent uptake of 2.5 μM [^3H]DHEAS was measured in the presence of the indicated conjugated steroids at concentrations of 25 μM and 250 μM . Cells incubated without inhibitor served as positive control and were set to 100%. Values represent percentage of DHEAS transport activity in the presence of the indicated inhibitor, relative to the positive control. Data presented means \pm SD of duplicate experiments, each with triplicate determinations ($n = 6$). *Comparison of the positive control to the inhibition with 25 μM or 250 μM inhibitor revealed a two-tailed P value of < 0.05 (unpaired t -test). #Not different from negative control.

LC-MS/MS analytics was not performed in our group so far, quantification of E_2 -17S and E_2 -diS first had to be established in the present study. Both compounds could be detected from reference samples and cell lysates with an LOQ of 1 ng/ml (Fig. 1). As shown in Fig. 3B, E_2 -3S and E_2 -17S were transported by SOAT in a sodium-dependent manner. In contrast, E_2 -diS, although detectable in the cell lysates (see Fig. 1C), could not be quantified under any experimental condition, also including transport experiments with very high concentrations of E_2 -diS (100 μM) and extended uptake time (30 min). Based on this data it can be concluded that E_2 -diS is not transported by SOAT.

The transport activity of SOAT for both, E_2 -3S and E_2 -17S first was surprising. However, this data can be explained by the high structural similarity of both compounds irrespective of their site of sulfo-conjugation. E_2 -3S and E_2 -17S are characterized by a planar steroid backbone in *trans-trans-trans* conformation, which is conjugated with a single negatively charged sulfate group at the one end and by a hydroxy group at the opposite site. When one compound is turned by 180 $^\circ\text{C}$ against the other one, this reveals a very close structural overlap, previously described as pseudo-symmetry of C19 steroids [13] (Fig. 4). Based on this model, addition of a second sulfate group might just structurally exceed the SOAT substrate-binding pocket, what would explain why E_2 -diS was not transported by SOAT (Fig. 4). As a further explanation, providing two sulfate groups with the substrate might abolish substrate recognition due to the high negative charge of the E_2 -diS molecule.

The role of E_2 -3S, e.g. for the proliferation of hormone-dependent breast cancer cells, has been extensively investigated in the past (for review see [12]). Here, E_2 -3S is taken up by a carrier-mediated process and the sulfate group is cleaved by the enzyme steroid sulfatase (STS) [13]. Estradiol (E_2) then activates estrogen receptors and so contributes to the proliferation of the malignant cells. Based on this mechanism, apart from estrogen receptor antagonists such as tamoxifen, also STS inhibitors such as STX64 are effective for breast cancer therapy [14]. In contrast, the role and quantitative plasma and urine appearance of E_2 -17S and E_2 -diS are not well understood [15]. However, serum and urine levels of E_2 -17S increase during pregnancy and so this compound might be relevant for the maintenance of gestation [16].

The transport data for E_2 -3S and E_2 -17S raised the question in which conformation the sulfate groups at the 3' and 17' positions must be oriented, so that the sulfated steroid can be accepted by SOAT as substrate. Interestingly, we found significant sodium-dependent transport for all compounds analyzed, being AnS (3 α), epiAnS (3 β), TS (17 β), and epiTS (17 α), indicating that the conformation of the sulfate group of these novel SOAT substrates is not distinctive for substrate recognition by SOAT. Besides, it was confirmed that apart from E_2 -17S indeed further 17-monosulfated steroids (TS, epiTS) are transported by SOAT. As additional test compound we used DHTS, which has a slightly different conformation of the A ring compared to TS due to 5 α -reduction, but shares the 17 β -sulfate group with TS. DHTS was significantly transported by SOAT and so can be included in the group of SOAT

substrates.

Our data allows us to further define the structural requirements of SOAT substrates. Whereas modifications in the conformation of the steroid backbone (e.g. for bile acids in *cis-trans-trans* conformation) or conjugation with glucuronic acid (e.g. 17 β -estradiol-3-glucuronide) preclude SOAT transport [3], the orientation of the sulfate group at the 3'- or 17'-positions is accepted in α - or β -orientation. This indicates that the hydrogen bond acceptor group represented by the negatively charged sulfate group can fit more flexible into the SOAT binding pocket.

Although no kinetic transport measurements were performed in the present study, the transport rates of the different substrates can be compared based on their transport ratios (transport in sodium-containing buffer vs. transport under sodium-free conditions). Interestingly, epiAnS was the most effective substrate in this regard with a transport ratio of 35 \times . The other 3-sulfates tested, AnS and E_2 -3S, also showed high transport ratios of 20 \times and 19 \times , respectively. However, there was no general rule for higher transport ratios of the 3-sulfates over the 17-sulfates, as at least DHTS was transported at a higher ratio (11 \times) than PregS (6 \times). Therefore, not the position of the sulfate group per se, but the overall conformation of the sulfated steroid seems to be relevant for the transport ratio of SOAT.

Historically, sulfated steroids were mostly considered as metabolic end products of active steroid hormones, because they are biologically inactive at classical androgen and estrogen steroid receptors [4]. However, STS can de-conjugate and thereby re-activate these molecules, which then can participate in the overall regulation of steroid responsive cells and organs (reviewed more in detail elsewhere [4,12,13]). So, sulfated steroids can be regarded as a circulating reservoir for the formation of biologically active steroid hormones in peripheral organs. In humans, the dominant circulating sulfated steroids are DHEAS (up to 10 μM), AnS (up to 5 μM) and PregS (up to 1 μM), while others only occur in nanomolar concentrations [13]. Although the physiological role of most of the sulfated steroids analyzed in the present study is not completely understood yet, we here demonstrate that all of them, except of E_2 -diS, can be transported into specific target cells by SOAT to trigger effects at the cellular level.

Conclusion

SOAT substrates from the group of sulfated steroids are characterized by a planar and lipophilic steroid backbone at *trans-trans-trans* conformation of the rings and a negatively charged mono-sulfate group at positions 3' or 17' with flexibility for α - or β -orientation. Furthermore, 5 α -reduction, 17 α -hydroxylation, and 16 α -hydroxylation are acceptable for SOAT substrate recognition. In contrast, addition of a second sulfate group seems to exceed the dimension of the SOAT binding pocket or the acceptable number of negative charges, and so E_2 -diS is not transported by SOAT. This structural information can help to optimize already established SOAT inhibitors [17], which might be

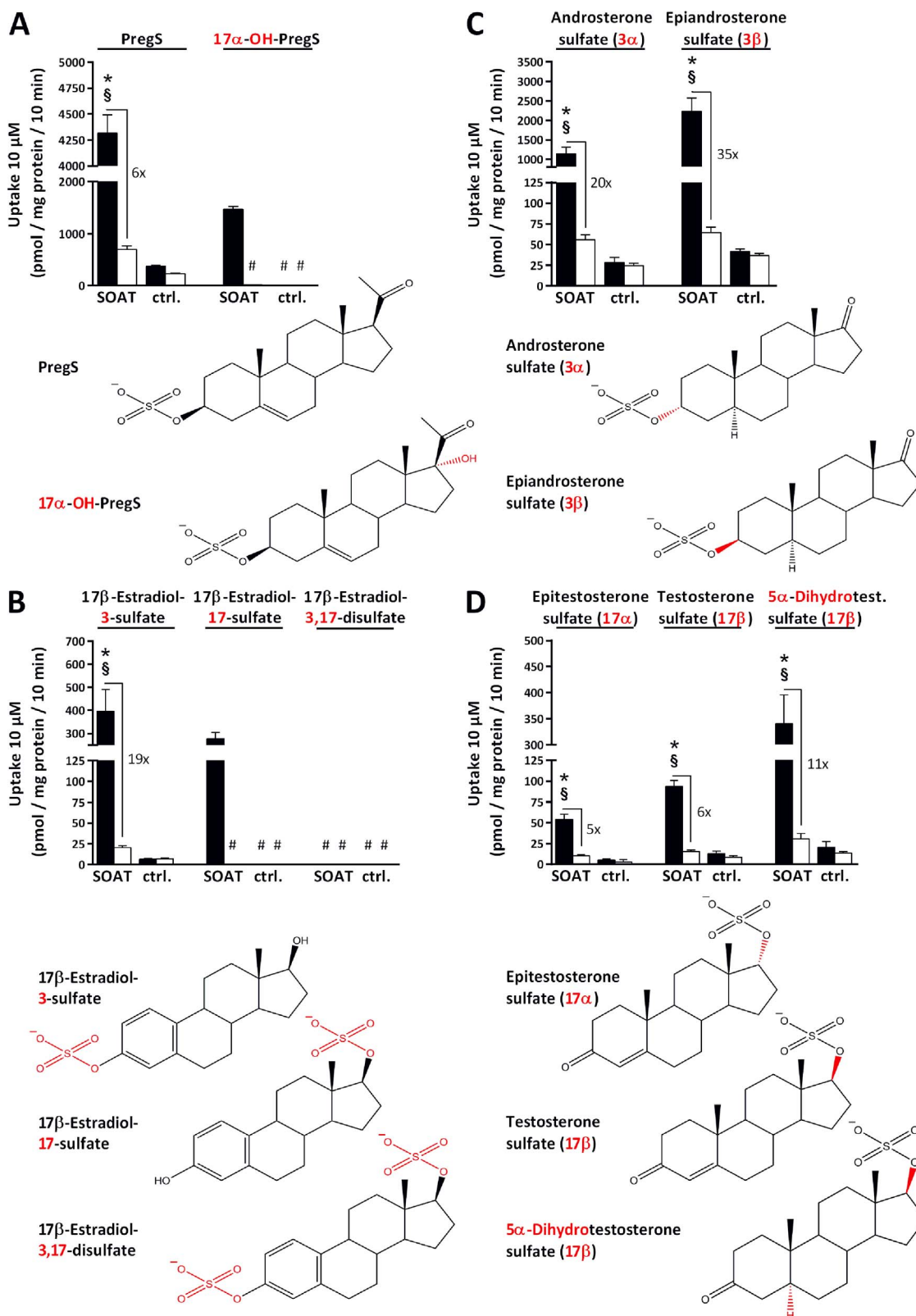


Fig. 3. SOAT-mediated transport of steroid 3-monosulfates and 17-monosulfates, but not of 17β-estradiol-3,17-disulfate.

SOAT-HEK293 cells were incubated with 10 μM of the indicated sulfated steroid in the presence (black bars) or absence (open bars) of sodium over 10 min at 37 °C. Cell lysates were analyzed by LC-MS/MS in order to determine the absolute cell-associated amount of the intact sulfated steroid molecules. (A) Uptake of PregS vs. 17α-OH-PregS. (B) Uptake of different 17β-estradiol sulfates: E₂-3S, E₂-17S, and E₂-diS. (C) Uptake of 3'-monosulfated steroids with α- or β-conformation of the 3'-sulfate group: AnS vs. epiAnS. (D) Uptake of 17'-monosulfated steroids with α- or β-conformation of the 17'-sulfate group: TS/DHTS vs. epiTS. Chemical structures of the respective sulfated steroids are illustrated. Data represent means ± SD of triplicate determinations of representative experiments (n = 3). *Significant transport activity compared with sodium-free control and §significant transport activity compared with control cells with p < 0.05 (one-way ANOVA). #Concentrations below the LOQ. Red color highlights the discriminable features of the respective compounds.

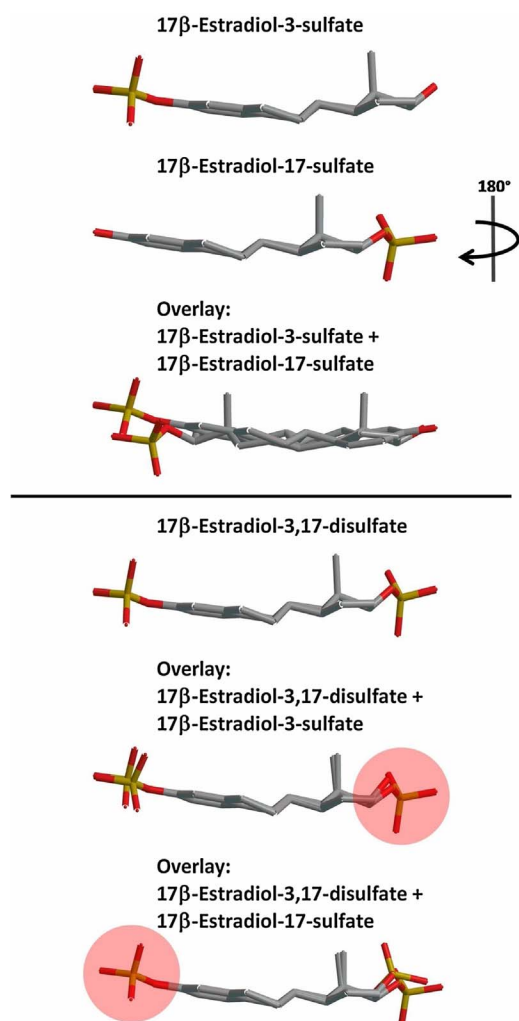


Fig. 4. Structural overlay of E₂-3S, E₂-17S, and E₂-diS. E₂-3S and E₂-17S show close structural overlap, when the latter compound is turned by 180 °C. The overlay of E₂-diS with either E₂-3S or E₂-17S depicts the additional space, which is filled by the second negatively charged sulfate group.

relevant for estrogen sulfate and androgen sulfate deprivation therapies, such as hormone-dependent breast or prostate cancer.

Acknowledgements

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Research GroupFOR1369“Sulfated Steroids in Reproduction” with grants to JG (GE1921/4-2) and SAW (WU148/6-2). The authors thank Klaus Schuh for technical help.

References

- [1] J. Geyer, J.R. Godoy, E. Petzinger, Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 300–306.
- [2] J. Geyer, T. Wilke, E. Petzinger, The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372 (2006) 413–431.
- [3] J. Geyer, B. Döring, K. Meerkamp, B. Ugele, N. Bakhiya, C.F. Fernandes, J.R. Godoy, H.R. Glatt, E. Petzinger, Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6), *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19728–19741.
- [4] J. Geyer, K. Bakhaus, R. Bernhardt, C. Blaschka, Y. Dezhkam, D. Fietz, G. Grosser, K. Hartmann, M.F. Hartmann, J. Neunzig, D. Papadopoulos, A. Sánchez-Guijo, G. Scheiner-Bobis, G. Schuler, M. Shihan, C. Wrenzycki, S.A. Wudy, M. Bergmann, The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 172 (2017) 207–221.
- [5] M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch, OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1260–1287.
- [6] C.E. Galuska, M.F. Hartmann, A. Sánchez-Guijo, K. Bakhaus, J. Geyer, G. Schuler, K.P. Zimmer, S.A. Wudy, Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS), *Analyst* 138 (2013) 3792–3801.
- [7] A. Sánchez-Guijo, V. Oji, M.F. Hartmann, H. Traupe, S.A. Wudy, Simultaneous quantification of cholesterol sulfate, androgen sulfates, and progesterone sulfates in human serum by LC-MS/MS, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1843–1851.
- [8] D. Fietz, K. Bakhaus, B. Wapelhorst, G. Grosser, S. Günther, J. Alber, B. Döring, S. Kliesch, W. Weidner, C.E. Galuska, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, M. Bergmann, J. Geyer, Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis—cellular localization, expression pattern and functional analysis, *PLoS One* 8 (5) (2013) e62638.
- [9] H. Schweigmann, A. Sánchez-Guijo, B. Ugele, K. Hartmann, M.F. Hartmann, M. Bergmann, C. Pfarrer, B. Döring, S.A. Wudy, E. Petzinger, J. Geyer, G. Grosser, Transport of the placental estriol precursor 16α-hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16α-OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and Ntcp-HEK293 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 259–265.
- [10] M.D. McLeod, C.C. Waller, A. Esquivel, G. Balcells, R. Ventura, J. Segura, Ó.J. Pozo, Constant ion loss method for the untargeted detection of bis-sulfate metabolites, *Anal. Chem.* 89 (2016) 1602–1609.
- [11] G. Grosser, D. Fietz, S. Günther, K. Bakhaus, H. Schweigmann, B. Ugele, R. Brehm, E. Petzinger, M. Bergmann, J. Geyer, Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (Slc10a6), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138 (2013) 90–99.
- [12] J.R. Pasqualini, G.S. Chetrite, Hormonal enzymatic systems in normal and cancerous human breast: control, prognostic factors, and clinical applications, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 9 (2012) 25–63.
- [13] J.W. Müller, L.C. Gilligan, J. Idkowiak, W. Arlt, P.A. Foster, The regulation of steroid action by sulfation and desulfation, *Endocr. Rev.* 36 (2015) 526–563.
- [14] J.M. Day, A. Purohit, H.J. Tutill, P.A. Foster, L.W. Woo, B.V. Potter, M.J. Reed, The development of steroid sulfatase inhibitors for hormone-dependent cancer therapy, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1155 (2009) 80–87.
- [15] H. Zhang, J. Henion, Quantitative and qualitative determination of estrogen sulfates in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using 96-well technology, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3955–3964.
- [16] I. Yoshizawa, K. Takanashi, K. Watanabe, T. Sato, H. Honjo, K. Tanaka, N. Sakuragi, S. Fujimoto, The physiological role of estradiol 17-sulfate during pregnancy, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 41 (1992) 567–570.
- [17] G. Grosser, K.H. Baringhaus, B. Döring, W. Kramer, E. Petzinger, J. Geyer, Identification of novel inhibitors of the steroid sulfate carrier 'sodium-dependent organic anion transporter' SOAT (SLC10A6) by pharmacophore modelling, *Mol. Cell. Endocrinol.* 428 (2016) 133–141.

PUBLIKATION #2

Bennien, J., Fischer, T., Geyer, J. (2018):

„Rare genetic variants in the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*): Effects on transport function and membrane expression“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 26-35

doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.004



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsmb

Rare genetic variants in the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (*SLC10A6*): Effects on transport function and membrane expression

Josefine Bennien, Thomas Fischer, Joachim Geyer*

Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus Liebig University Giessen, Germany



ARTICLE INFO

Keywords:

SOAT
Genetic variants
Sulfated steroids
Transport
Membrane expression
SLC10A6
Structure

ABSTRACT

Sulfo-conjugated steroid hormones, such as dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), pregnenolone sulfate or estrone-3-sulfate are abundant in the body, but are biologically inactive at classical androgen and estrogen steroid receptors. However, after carrier-mediated import and de-conjugation by the steroid sulfatase, these compounds participate in the overall steroid regulation of reproductive organs. The sodium-dependent organic anion transporter SOAT, coded by the *SLC10A6* gene, is specific for the transport of steroid sulfates and is highly expressed in testicular germ cells, including pachytene spermatocytes, secondary spermatocytes, and round spermatids. Therefore, SOAT is supposed to be involved in the regulation of spermatogenesis and male fertility. In the present study, the *SLC10A6* gene was analyzed for rare genetic variants, which might affect transport function or membrane expression of SOAT. Among the 31 SOAT variants analyzed, L44P, Q75R, P107L, G109S, S112F, N113K, S133F, G241D, G263E, G294R, and Y308N showed no transport activity for DHEAS at all. In the case of P107L, G241D, G263E, and Y308N, this was most likely due to significantly reduced expression in the plasma membrane. Other variants are located directly at (Q75R, S112F, N113K) or close to (G109S, S133F, and G263E) the supposed SOAT Na⁺ binding sites and thus could disable the sodium-coupled transport cycle. If these loss-of-function SOAT variants are more frequent in men with impaired spermatogenesis or infertility needs further investigation.

1. Introduction

In contrast to free estrogens and androgens, which act via their respective nuclear receptors, sulfo-conjugated steroid hormones such as dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), testosterone sulfate, or estrone-3-sulfate (E₁S) are biologically inactive at these receptors [1]. Steroid sulfates are abundant in the body and reach plasma concentrations in the micromolar range, being much higher than the plasma concentrations of the corresponding free steroids (e.g. 1–10 μmol/L DHEAS vs. 2–30 nmol/L dehydroepiandrosterone) [2]. Steroid sulfo-conjugation is mediated by enzymes of the sulfo-transferase family and represents an inactivation step for sex steroid hormones [3]. However, as an opposing reaction, the enzyme steroid sulfatase (STS) can de-conjugate, and thereby re-activate sulfo-conjugated steroid hormones, which then participate in the overall steroid regulation via the classical steroid receptors (so-called sulfatase pathway) [4,5]. But prior to cleavage, steroid sulfates must be imported into specific STS-expressing target cells. Due to their negative charge, this process requires regulated uptake via plasma membrane

transporters [1,2].

The sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) represents such a transporter and has proved to be very specific for the transport of sulfo-conjugated steroid hormones, including pregnenolone sulfate (PREGS), DHEAS, 16α-OH-DHEAS, E₁S, estradiol-3-sulfate, and androstenediol-3-sulfate [6–9]. As SOAT is highly expressed in testicular germ cells, including pachytene spermatocytes, secondary spermatocytes, and round spermatids, this carrier is supposed to be involved in the regulation of spermatogenesis and male fertility [7]. In order to elucidate if functionally impaired SOAT variants might be more frequent in males with reproductive problems or infertility, SOAT genetic variants were recorded from the relevant databases and were analyzed for transport function and membrane expression. In a previous study, some common and longer-known genetic variants of SOAT were analyzed, namely S6F, I114V, R185T, I196T, V199I, and L204F. Among them, only SOAT L204F showed significantly impaired transport function, most likely by hindering proper membrane expression [10]. However, SOAT L204F was found in subjects with hypospermatogenesis as well as in men with normal spermatogenesis at same frequencies,

Abbreviations: ASBT, apical sodium-dependent bile acids transporter; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; E₁S, estrone-3-sulfate; PREGS, pregnenolone sulfate; SOAT, sodium-dependent organic anion transporter; STS, steroid sulfatase; WT, wild type

* Corresponding author at: Institute of Pharmacology and Toxicology, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Schubertstr. 81, 35392 Giessen, Germany.

E-mail address: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de (J. Geyer).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2017.09.004>

Received 14 March 2017; Received in revised form 25 August 2017; Accepted 5 September 2017

Available online 08 September 2017

0960-0760/ © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

indicating that this genetic variant seems not to be causative for hypospermatogenesis per se. To continue this work, in the present study more rare genetic variants of SOAT were analyzed, which were quite recently discovered. Surprisingly, virtually all of them showed significantly reduced transport activity. This can only partly be explained by sorting defects to the plasma membrane.

We localized all SOAT variants in a 3D homology model of human SOAT, based on the crystal structures of two bacterial homologs from *Neisseria meningitidis* (ASBT_{NM}) and *Yersinia frederiksenii* (ASBT_{Yf}) [15,16]. In man, ASBT represents an intestinal bile acid transporter, which has among the SLC10 carrier family the highest sequence homology to SOAT [6]. SOAT and ASBT are both characterized by a strictly sodium-dependent transport mode and share highly conserved amino acids at the supposed sites of sodium binding. Some of the loss-of-function SOAT variants are located directly at or closely to these sodium-binding sites, and thus could disable the sodium-coupled transport cycle.

2. Material and methods

2.1. Materials

All of the chemicals, unless otherwise stated, were obtained from Sigma-Aldrich. [³H]DHEAS was purchased from PerkinElmer Life Sciences.

2.2. Generation of the polymorphic HA-SOAT constructs

In order to generate an N-terminally HA-tagged SOAT construct, the previously described SOAT-pcDNA5 vector [6] was used as a template for site-directed mutagenesis. This construct showed transport activity as well as membrane expression comparable to the wild type SOAT (SOAT-WT) and, therefore, was used as a template for all further mutagenesis experiments. Based on the HA-SOAT-pcDNA5 construct, a total of 31 polymorphic constructs (Table 1) were obtained by site-directed mutagenesis as reported before [10]. 50 ng template DNA were used and mutagenesis was performed with the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies), according to the manufacturer's protocol and the primers listed in Table 1. PCR products were incubated with *DpnI* for 1 h at 37 °C in order to eliminate template DNA and were transformed to One Shot TOP10 *E. coli* chemically competent cells (Invitrogen). Correct constructs were selected based on DNA sequencing and were used for transfection into GripTite HEK293 MSR cells, which show improved adherence by stably expressing the human macrophage scavenger receptor (Invitrogen).

2.3. Transport experiments with the polymorphic HA-SOAT constructs

Functional characterization of the polymorphic HA-SOAT constructs was performed after transient transfection into GripTite HEK293 MSR cells as described previously [7]. These cells were cultivated in D-MEM/F12 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma), L-glutamine (4 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 µg/ml) at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity. Cells were plated into 24-well plates with 3 × 10⁵ cells per well and transfected after 2 h with 0.5 µg of the respective pcDNA5 construct per well by Lipofectamine 2000 (Life Technologies), as recommended in the manufacturer's protocol. After 48 h of incubation, cells were washed once with phosphate buffered saline (PBS, containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 7.3 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 37 °C). Then, cells were pre-incubated with transport buffer (142.9 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂, and 20 mM HEPES, pH 7.4, 37 °C) for 10 min. For control, all transport experiments were also performed in sodium-free transport buffer where sodium chloride was replaced by equimolar concentrations of choline chloride. Transport studies were performed by incubating the transfected cells with 250 µl

transport buffer containing 10 µM DHEAS, including 0.05% [³H]DHEAS, for 15 min at 37 °C. Uptake studies were terminated by removing the transport buffer and five washing steps with ice-cold PBS. Afterwards, cells were lysed in 1 N NaOH with 0.1% SDS and the cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting as described before [6]. For normalization of the transport data, protein content was calculated using the BCA protein assay kit (Novagen) as reported before [7].

2.4. Measurement of total and surface SOAT protein expression by immunofluorescence

In order to measure total SOAT protein expression as well as plasma membrane expression, transiently transfected GripTite HEK293 MSR cells were used for immunofluorescence detection with an anti-HA antibody. Cells were either permeabilized in order to measure the total HA-SOAT content or used non-permeabilized for surface HA-SOAT detection with an anti-HA antibody. For both approaches, 6 × 10⁴ cells per well were seeded in poly-L-lysine-coated black 96-well plates with clear bottom (Greiner) and transfected as described above with 100 ng DNA and 0.3 µl Lipofectamine 2000 per well. 48 h after transfection, medium was removed and cells were washed three times with PBS. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature, washed twice with PBS for 5 min, once with 20 mM glycine in PBS for 10 min, and finally twice with PBS for 5 min. Then, one part of the cells was permeabilized for 5 min in PBS buffer supplemented with 0.2% Triton X-100 and washed with PBS for 5 min. The other part was not treated and remained under PBS during the permeabilization step. Both preparations were placed in blocking solution containing 4% goat serum for 1 h. Afterwards, cells were incubated with the mouse anti-HA antibody (Thermo Fisher 32-6700) at a final concentration of 1.25 µg/ml in blocking solution for 1 h. Cells were washed three times with PBS and incubated with the Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG secondary antibody (Thermo Fisher A-11029) at a final concentration of 2.5 µg/ml in blocking solution for 1 h. Cells were washed twice with PBS and once with the cell permeable DNA marker Hoechst 33342 at 15 µg/ml in PBS for 5 min. After a final washing procedure, cells were placed in a fluorescence reader (Tecan SPARK 10 M) and analyzed regarding Alexa Fluor 488 and Hoechst 33342 fluorescence.

2.5. Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence microscopy, GripTite HEK293 MSR cells were seeded on poly-L-lysine coated glass coverslips in 24-well plates with a density of 1 × 10⁵ cells per well and were transfected as reported above. Cells were washed once in PBS, fixed with 4% PFA in PBS for 5 min at room temperature, washed three times with PBS and blocked with blocking buffer BB (PBS, 10% donkey serum, 0.05% Triton X-100) for 1 h at room temperature. Cells were incubated overnight at 4 °C in BB with the following antibodies: mouse anti-HA (Thermo Fisher 32-6700) and rabbit-anti-calnexin (Sigma C4731) at a dilution of 1:400 and 1:250, respectively. Cells were washed three times in PBS and incubated for 1 h at room temperature in BB with the respective secondary antibody, Dylight594-conjugated donkey anti-rabbit (Rockland 611-742-127) or Alexa Fluor 488-labeled donkey anti-mouse (Thermo Fisher R37114), at a 1:500 dilution. Again, cells were washed three times in PBS and coverslips were mounted on microscopy slides using ProLong Diamond Antifade (Thermo Fisher). Samples were analyzed the next day on a Leica DM5500 fluorescent microscope. Captured images were analyzed with the Leica Fluorescence Workstation software LAS AF 6000.

2.6. Homology modelling

In order to generate a 3D homology model, the SOAT protein

Table 1
Mutagenesis primers used to generate the polymorphic SOAT constructs.

Construct	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
HA-SOAT-WT	CGC CCT TAC CAT GTA TCC ATA TGA TGT CCC AGA TTA TGC CAG AGC CAA TTG TTC	GAA CAA TTG GCT CTG GCA TAA TCT GGG ACA TCA TAT GGA TAC ATG GTA AGG GCG
HA-SOAT-L44P	CAC TGT GAT GAT GGG GCC GCT CAT GTT CTC	GAG AAC ATG AGC GGC CCC ATC ATC ACA GTG
HA-SOAT-C51Y	CTC ATG TTC TCT TTG GGA TAT TCC GTG GAG	CTC CAC GGA ATA TCC CAA AGA GAA CAT GAG
HA-SOAT-Q75R	CAT TGC TGT GGG ACT GCT CTG CCG GTT TGG	CCA AAC CGG CAG AGC AGT CCC ACA GCA ATG
HA-SOAT-M79V	CTG CCA GTT TGG GCT CGT GCC TTT TAC AGC	GCT GTA AAA GGC ACG AGC CCA AAC TGG CAG
HA-SOAT-A83V	CTC ATG CCT TTT ACA GTT TAT CTC CTG GCC	GGC CAG GAG ATA AAC TGT AAA AGG CAT GAG
HA-SOAT-V100A	GTC CAA GCT ATT GCT GCT CTC ATC ATG GGC	GCC CAT GAT GAG AGC AGC AAT AGC TTG GAC
HA-SOAT-P107L	CAT GGG CTG CTG CCT GGG GGG CAC CAT CTC	GAG ATG GTG CCC CCC AGG CAG CAG CCC ATG
HA-SOAT-G109S	CCC GGG GAG CAC CAT CTC TAA CAT TTT CAC	GTG AAA ATG TTA GAG ATG GTG CTC CCC GGG
HA-SOAT-S112F	GGC ACC ATC TTT AAC ATT TTC ACC TTC TGG	CCA GAA GGT GAA AAT GTT AAA GAT GGT GCC
HA-SOAT-N113K	GGC ACC ATC TCT AAG ATT TTC ACC TTC TGG	CCA GAA GGT GAA AAT CTT AGA GAT GGT GCC
HA-SOAT-S133F	AGT ATG ACA ACC TGT TTC ACC GTG GCC GCC	GGC GGC CAC GGT GAA ACA GGT TGT CAT ACT
HA-SOAT-A137T	TGT TCC ACC GTG GCC ACC CTG GGA ATG ATG	CAT CAT TCC CAG GGT GGC CAC GGT GGA ACA
HA-SOAT-A137V	TGT TCC ACC GTG GCC GTC CTG GGA ATG ATG	CAT CAT TCC CAG GAC GGC CAC GGT GGA ACA
HA-SOAT-M140I	CCG CCC TGG GAA TCA TGC CAC TCT GCA TTT	AAA TGC AGA GTG GCA TGA TTC CCA GGG CGG
HA-SOAT-S151F	TTT ATC TCT ACA CCT GGT CTT GGA GTC TTC	GAA GAC TCC AAG ACC AGG TGT AGA GAT AAA
HA-SOAT-P161S	CAG CAG AAT CTC ACC ATT TCT TAT CAG AAC	GTT CTG ATA AGA AAT GGT GAG ATT CTG CTG
HA-SOAT-K195N	TCA TTC TCA ACA TTG GGG CCG TTG TTG GTG	CAC CAA CAA CGG CCC CAA TGT TGA GAA TGA
HA-SOAT-I196M	TCA TTC TCA AGA TGG GGG CCG TTG TTG GTG	CAC CAA CAA CGG CCC CCA TCT TGA GAA TGA
HA-SOAT-S230N	CAC CCT TCT GAC CAT CAA TTT CAT CTT TCC	GGA AAG ATG AAA TTG ATG GTC AGA AGG GTG
HA-SOAT-G241D	CCA TGT CAC GGA TTT TCT GCT GGC ACT TTT	AAA AGT GCC AGC AGA AAA TCC GTG ACA TGG
HA-SOAT-G263E	CCT TAG AAA CTG AAG CTC AGA ATA TTC AGA	TCT GAA TAT TCT GAG CTT CAG TTT CTA AGG
HA-SOAT-G294R	TTG AGT TTC CCA CTG GCC TAT AGA CTC TTC	GAA GAG TCT ATA GGC CAG TGG GAA ACT CAA
HA-SOAT-F296L	CAC TGG CCT ATG GAC TCC TCC AGC TGA TAG	CTA TCA GCT GGA GGA GTC CAT AGG CCA GTG
HA-SOAT-Y308N	ATT GTT GCA GCA AAT CAG ACG TAC AAG AGG	CCT CTT GTA CGT CTG ATT TGC TGC AAC AAT
HA-SOAT-nt474(del1)	CCC GGG GGC ACC ATC TCT AAC ATT TTC AC	GTG AAA ATG TTA GAG ATG GTG CCC CCG GG
HA-SOAT-nt474(insG)	CCG GGG GGG CAC CAT CTC TAA CAT TTT CAC C	GGT GAA AAT GTT AGA GAT GGT GCC CCC CCG G
HA-SOAT-nt665(del10)	CCC TTG TGT GGC TGT TCT TGG TGT CTA	TAG ACA CCA AAG GCC ACA GGC ACA CAA GGG
HA-SOAT-nt828(del1)	CAG ACA TCA CCC TTG GAC CAT CAG TTT CAT C	GAT GAA ACT GAT GGT CGA AGG GTG ATG TCT G
HA-SOAT-nt1024(del1)	GTT GAG TTT CCC ACT GGC TAT GGA CTC TTC	GAA GAG TCC ATA GCC AGT GGG AAA CTC AAC
HA-SOAT-nt1033(del2)	CCC ACT GGC CTA TGG ACT TCC AGC TGA TAG AT	ATC TAT CAG CTG GAA GTC CAT AGG CCA GTG GG
HA-SOAT-nt1113(insA)	CAT GGA AAA AAA GAA CTC AGG TTG CAC AGA AGT CTG	CAG ACT TCT GTG CAA CCT GAG TTC TTT TTT TCC ATG

Note: All primers were selected based on the SOAT cDNA sequence with GenBank accession number NM_197965.

sequence with GenBank accession No. ABO38126 was used as a target sequence for the SWISS-MODEL tool [11–14]. Models were calculated based on the templates of ASBT from *Neisseria meningitidis* (ASBT_{NM}, PDB 3zuy, sequence identity to SOAT of 21.64% [15]) and ASBT from *Yersinia frederiksenii* (ASBT_{Yf}, PDB 4n7w, sequence identity to SOAT of 20.45% [16]). The N-terminus of SOAT was oriented to the outside and the C-terminus to the intracellular site, following experimental data [6]. Amino acids 1–36 of the SOAT N-terminus as well as amino acids 312–377 of the C-terminus could not be depicted at the model, meaning that the SOAT 3D model only covers amino acids 37–311, thus representing the SOAT protein from TMD1 to TMD9.

3. Results

In order to get an updated overview of the naturally occurring genetic variants of SOAT, the SNP database was searched via the National Center for Biotechnology Information platform with the gene name *SLC10A6* as the query. A total list of about 350 hits was obtained (date of search September 2015). The results were narrowed by only focusing on the variants present in the open reading frame, as the present study aimed to analyze only effects at the protein level rather than mRNA expression level. This reduced the total hit number to 148. As a further criterion, only SNPs on conserved amino acids based on multiple species sequence alignment for the SOAT protein were selected (data not shown). Finally, bioinformatic evaluations were performed with the PolyPhen and SIFT algorithms. This resulted in a total number of 24 SNPs, which were predicted as probably or possibly damaging by both programs (Table 2A) plus seven frame shift mutations (Table 2B). Of note, the used criteria excluded all of the more common SOAT variants, which were analyzed in a previous study [10].

It was intended to test the transport function and membrane expression of the selected SOAT genetic variants independent from the

custom-made SOAT_{2–17} antibody (Eurogentec), which was previously used to localize the SOAT protein in the plasma membrane [6], but which is only available in residual amounts. A further aim was to detect total SOAT protein expression as well as plasma membrane expression in a single approach, excluding our custom-made SOAT_{311–377} antibody (Eurogentec), which is directed against the intracellular C-terminus of SOAT [7]. Finally, it was decided to introduce an HA-tag into the extracellular N-terminus of SOAT that can be detected in the plasma membrane in non-permeabilized cells (indicating plasma membrane expression) as well as in permeabilized cells (representing total SOAT protein expression). Preparatory experiments confirmed transport activity as well as plasma membrane expression of the HA-SOAT construct comparable to the SOAT-WT protein (data not shown). Then, a respective cDNA construct was generated for each of the 31 SOAT variants by site-directed mutagenesis. All constructs were sequence verified and then transiently transfected into HEK293 cells for the transport and immunofluorescence experiments. Transport experiments were performed with 10 μM DHEAS in at least three independent experiments with quadruplicate determinations each (total of n = 12). As shown in Fig. 1A, nearly all HA-SOAT variants showed significantly lower transport activity compared to HA-SOAT-WT. The variants L44P, Q75R, P107L, G109S, S112F, N113K, S133F, G241D, G263E, G294R, and Y308N did not show any significant transport activity at all. Nt1113(insA) was the only frame shift variant with residual transport activity from the group of insertion/deletion frameshift variants. Among these 31 SOAT variants, only two proved transport activity at the level of the HA-SOAT-WT, namely M140I and S151F. Interestingly, analysis of the plasma membrane expression of the SOAT variants revealed an opposite pattern. Most of the constructs showed an intact plasma membrane expression. Only very few SOAT variants revealed significant impairment of plasma membrane sorting, namely A83V, P107L, G241D, G263E, and Y308N, as well as all frameshift variants

Table 2A
SOAT genetic variants analyzed in the present study.

SNP	Nucleotide position ^a	Nucleotide substitution ^b	Amino acid substitution	PolyPhen prediction	SIFT prediction	Minor allele frequency (%) ^c
rs774744746	279	CTG → CCG	L44P	probably damaging	damaging	0.025 ¹
rs376640232	300	TGT → TAT	C51Y	probably damaging	damaging	0.011–0.5 ^{1–3}
rs376640232	372	CAG → CGG	Q75R	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs374782349	383	ATG → GTG	M79V	probably damaging	damaging	0.0008–0.012 ^{1,3}
rs140433007	396	GCT → GTT	A83V	probably damaging	damaging	0.012–0.022 ^{3,4}
rs768475512	447	GTT → GCT	V100A	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs768475512	468	CCG → CTG	P107L	probably damaging	damaging	0.012–0.045 ^{1,3,4}
rs144612845	473	GGC → AGC	G109S	probably damaging	damaging	0.01–0.4 ^{1–5}
rs781365802	483	TCT → TTT	S112F	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs369966485	487	AAC → AAG	N113K	probably damaging	damaging	0.0016–0.012 ^{1,3}
rs761317022	546	TCC → TTC	S133F	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs775035778	557	GCC → ACC	A137T	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs554846008	558	GCC → GTC	A137V	probably damaging	damaging	0.0008–0.1 ^{1,2}
rs770781570	568	ATG → ATC	M140I	possibly damaging	damaging	0.0025 ¹
rs780234942	600	TCC → TCT	S151F	possibly damaging	damaging	0.0033 ¹
rs374917571	629	CCT → TCT	P161S	probably damaging	damaging	0.0017 ¹
rs778513592	733	AAG → AAC	K195N	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs779569277	736	ATT → ATG	I196M	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs777581552	837	AGT → AAT	S230N	possibly damaging	damaging	0.0016 ¹
rs376017123	870	GGT → GAT	G241D	probably damaging	damaging	0.011–0.045 ^{1,3}
rs759221196	936	GGA → GAA	G263E	probably damaging	damaging	0.0025 ¹
rs144273089	1028	GGA → AGA	G294R	probably damaging	damaging	0.045–1.1 ^{1–4,6}
rs750467546	1034	TTC → CTC	F296L	probably damaging	damaging	0.0008 ¹
rs373961468	1070	TAT → AAT	Y308N	probably damaging	damaging	0.0008–0.023 ^{1,3}

^a Referred to GenBank accession no. NM_197965.^b Polymorphic nucleotide in bold.^c Range from different sources: ¹EVA_EXAC:ExAc_Aggregated_Populations, ²1000 Genomes Project Phase 3, ³NHLBI Exome Sequencing Project, ⁴NHLBI-ESP:ESP_Cohort_Populations, ⁵Exome Aggregation Consortium (ExAC), ⁶CLINSEQ_SNP:CSAgent.**Table 2B**
Frame shift SOAT variants analyzed in the present study.

Frameshift	Insertion or deletion ^a	Sequence change after amino acid position	Premature stop after amino acid position	Minor allele frequency (%) ^b
rs753933531	nt474(del1)	108	128	–
rs764544057	nt474(insG)	108	112	0.002
rs772468172	nt665(del10)	171	178	0.012
rs772892498	nt828(del1)	226	234	0.0008
rs780884224	nt1024(del1)	291	297	0.0008
rs768649921	nt1033(del2)	294	347	0.01
rs773863398	nt1113(insA)	323	348	0.0008

^a Referred to GenBank accession no. NM_197965.^b Source: EVA_EXAC:ExAc_Aggregated_Populations.

(Fig. 1B). Some other variants showed reduced plasma membrane expression, but still above a level of 50% compared with HA-SOAT-WT. Finally, total SOAT protein expression was analyzed in permeabilized cells and showed comparable levels over all SOAT variants, indicating that our transfection and immunofluorescence protocols were sufficiently standardized (Fig. 1C). As the only exception, the frame shift variants nt474(del1) and nt474(insG) revealed significantly lower total SOAT protein expression compared to HA-SOAT-WT.

Combining all data from the transport and the surface expression analysis, three different categories of SOAT variant behavior were identified (always referring to HA-SOAT-WT): 1a (dark green), DHEAS transport activity unaffected and plasma membrane expression above 50%; 1b (light green), transport activity above 50% and plasma membrane expression above 50%; 2a (light red), impaired transport activity below 50%, but plasma membrane expression above 50%; 2b (dark red), no transport activity for DHEAS, but plasma membrane expression above 50%; 3 (blue), impaired plasma membrane expression and probably due to that absent transport activity.

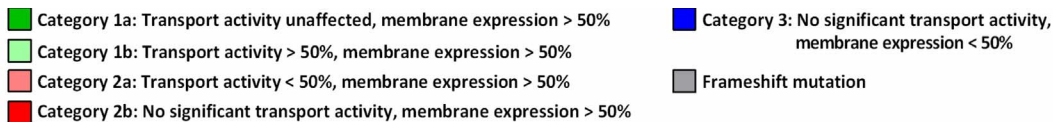
Representative variants were additionally analyzed by qualitative immunofluorescence microscopy (Fig. 2). HA-SOAT-WT, SOAT-S151F

(category 1a), and SOAT-S112F (category 2b) were clearly detected at the plasma membrane in the non-permeabilized cells. In contrast, SOAT-G241D (category 3) was rarely found at the plasma membrane in non-permeabilized cells and revealed significant co-localization with the ER marker calnexin, pointing to a retention in the sorting process of this variant in the ER (Fig. 2). Co-localization with calnexin was also seen in single cells for the other variants of category 1a, 1b, 2a and 2b. However, here the SOAT protein was also detected at the plasma membrane, so that ER localization can in these cases be interpreted as an intermediate sorting step through the ER rather than retention in the ER as it is the case for G241D (Fig. 2).

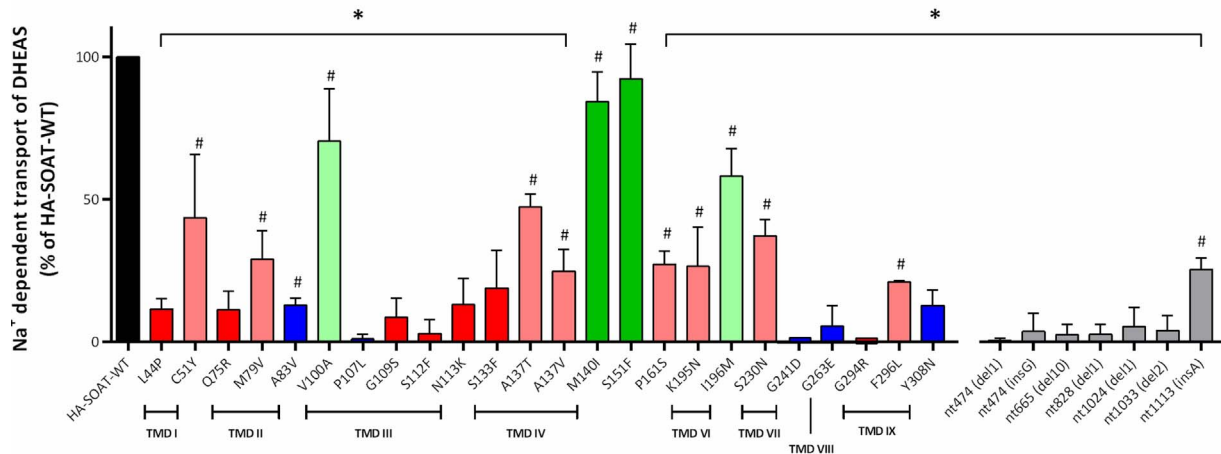
All analyzed SOAT variants were depicted on a 3D homology model of human SOAT, based on the crystal structures of ASBT_{NM} [15] and ASBT_{YF} [16]. Within this model two structural domains can be separated: a more rigid core domain, which contains the proposed sodium-binding site and a more flexible panel domain, which enables transport of the substrate by conformational changes relative to the core domain [15].

The polymorphic amino acids from category 3, namely A83V, P107L, G241D, G263E, and Y308N, are all located at the core domain and most of them are oriented towards the outer space of the SOAT protein. In contrast, the category 2b variants Q75R, G109S, S112F, N113K, S133F, and G294R are located more at the inner area of the core domain. This inner area contains specific amino acids, which participate in the binding of the two sodium ions in the ASBT_{NM} structure (Fig. 4A). Most of these amino acids are highly conserved among the SLC10 carriers and are also present in SOAT at the corresponding positions (Fig. 4B). Three of these amino acids, namely S112F, N113K, and Q75R, are polymorphic in SOAT and the respective SOAT variants are completely transport negative. Other polymorphic sites of SOAT are located in close proximity to the sodium-binding sites and the respective SOAT variants also show completely abolished transport activity: P107L, G109S, S133F, and G263E (Fig. 4C). In total, 7 out of 11 loss-of-function variants are located at or close to the supposed sodium-binding sites of SOAT (Fig. 4C).

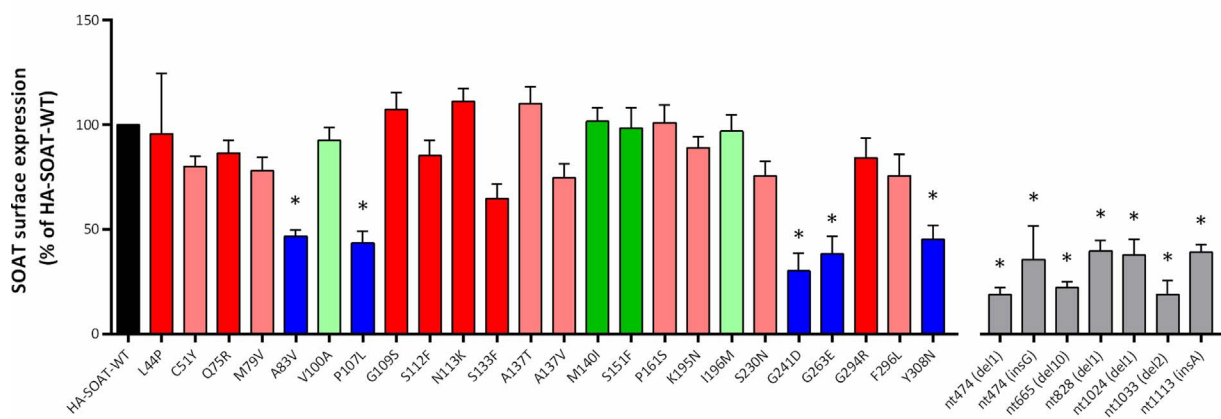
Closer analysis of the frameshift variants revealed that most of them



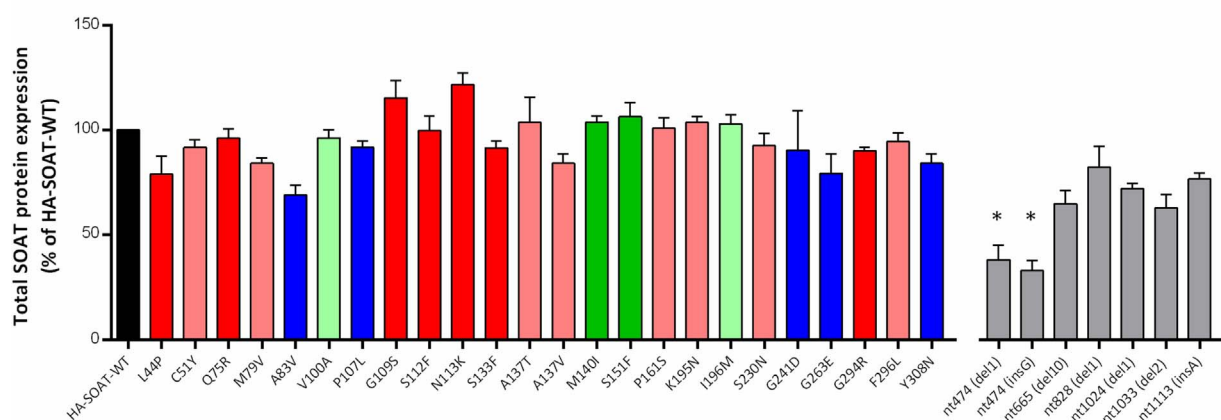
A



B



C



(caption on next page)

Fig. 1. Most of the SOAT variants show reduced transport function and/or impaired surface expression.

(A) Transport experiments were performed in transiently transfected HEK293 cells with 10 μ M DHEAS. The Na⁺-dependent transport activity of HA-SOAT-WT was set to 100%. Data are combined from three independent experiments each with quadruplicate determinations (total of n = 12) and are given as mean \pm SD. For statistical analysis, one way ANOVA was applied. *Significantly lower compared to HA-SOAT-WT with $p < 0.05$. #Variants maintain significant Na⁺-dependent transport activity with $p < 0.05$. (B) SOAT surface expression was analyzed with an anti-HA antibody under non-permeabilized conditions and cell-associated fluorescence was quantified in relation to HA-SOAT-WT. Data represent means \pm SEM of four independent experiments. For statistical analysis, one way ANOVA was applied to the unmodified raw fluorescence data of each experiment. *Significantly lower SOAT surface expression compared to HA-SOAT-WT with $p < 0.0001$ for all four experiments. (C) Total SOAT protein expression was determined with the anti-HA antibody after permeabilization. *Significantly lower total SOAT protein compared to HA-SOAT-WT with $p < 0.0001$ for all four experiments.

significantly truncate the SOAT protein at TMD3 (nt474(insG)), TMD4 (nt474(del1)), TMD5 (nt665(del10)), TMD7 (nt828(del1)) and TMD9 (nt1024(del1)) (Fig. 5). Additionally, off-frame extensions of the SOAT protein of 3–20 amino acids were produced. None of these proteins showed any transport activity for DHEAS and all of them exhibited significantly reduced plasma membrane expression. Only SOAT nt474(insG) and SOAT nt474(del1) showed reduced total protein expression, whereas all other frameshift variants revealed comparable total protein expression with HA-SOAT-WT. Most interesting among the

frameshift variants are nt1033(del2) and nt1113(insA): The frameshift of nt1033(del2) is located within TMD9 and produces an off-frame sequence of 52 amino acids at the C-terminus. Although this variant covers 77% of the SOAT-WT sequence up to the middle of TMD9, transport activity is completely abolished (Fig. 5). In contrast, nt1113(insA) which covers the SOAT-WT sequence up the first quarter of the C-terminus maintained significant sodium-dependent transport activity for DHEAS, but also showed reduced surface expression.

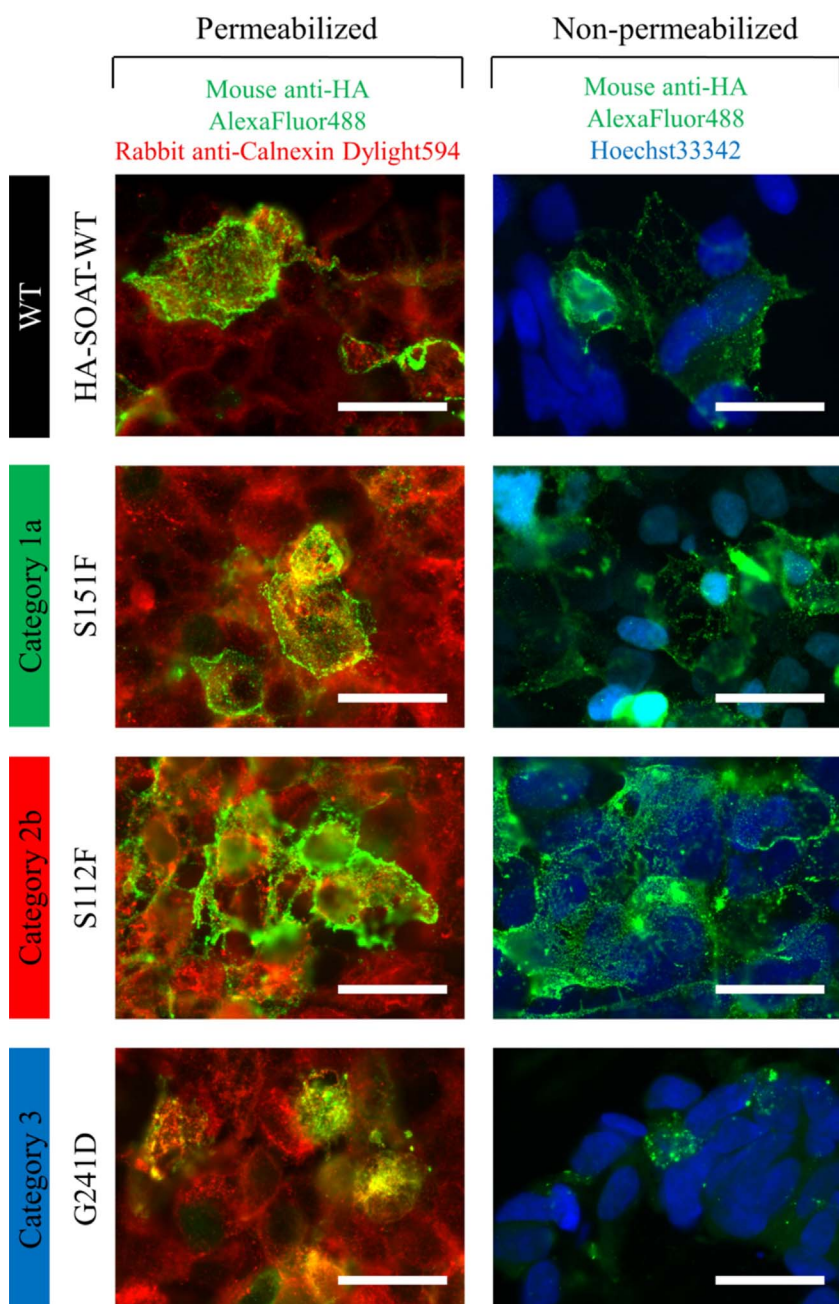


Fig. 2. Impaired plasma membrane sorting of category 3 SOAT variants. Representative SOAT variants of categories 1–3 were transfected into HEK293 cells and labeled with the anti-HA antibody (green fluorescence) under permeabilized (left panel) or non-permeabilized (right panel) conditions. Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (blue fluorescence) and calnexin was detected with red fluorescence. Scale bars represent 25 μ m.

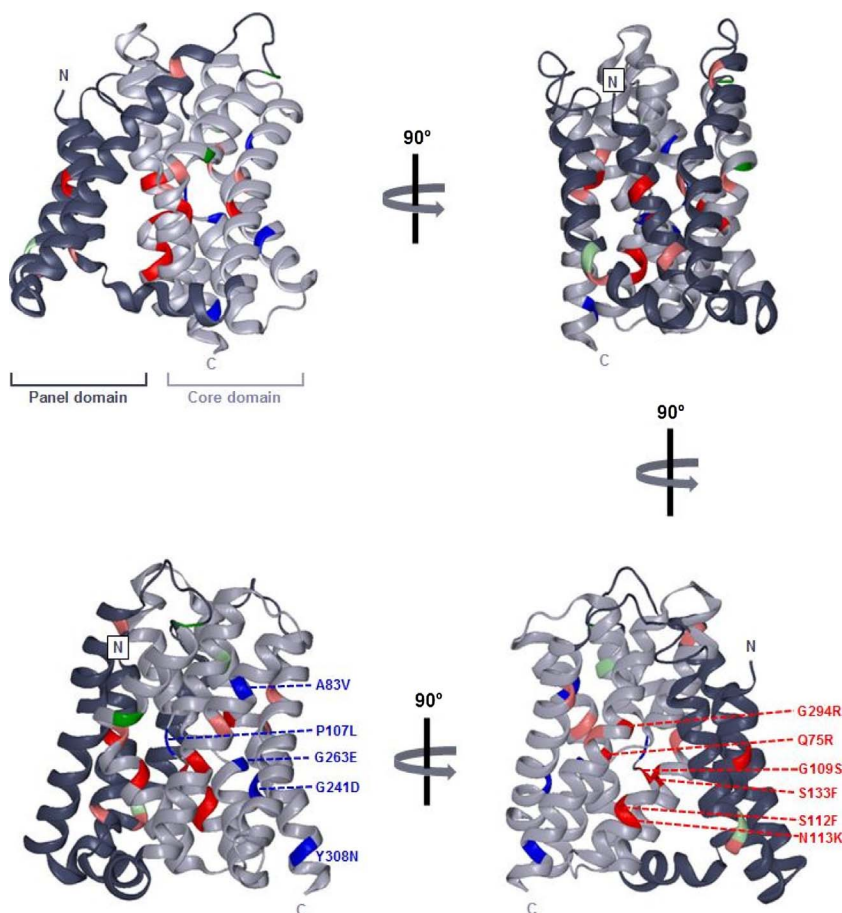


Fig. 3. Most of the category 2 and 3 SOAT variants are located at the core domain of the SOAT protein.

The SOAT 3D homology model was generated by SWISS-MODEL as outlined under Material and methods. It represents amino acids 37–311 of the SOAT protein. The panel domain is depicted in dark grey and the core domain is light grey. All polymorphic amino acids are highlighted according to the color scheme introduced in Fig. 1.

4. Discussion

There is increasing evidence that not only free androgens and estrogens, but also sulfated steroid hormones such as PREGS, DHEAS, and testosterone sulfate, after cleavage by STS, participate in the overall regulation of testicular functions [1,17]. As an example, PREGS, DHEAS and androstenediol-3-sulfate can be metabolized to testosterone in the human testis [18–20]. However, prior to STS cleavage this process requires an uptake of these negatively charged compounds by specific membrane carriers. SOAT represents a carrier, which specifically transports steroid sulfates including PREGS, DHEAS, 16 α -OH-DHEAS, E₁S, estradiol-3-sulfate, and androstenediol-3-sulfate in a sodium-dependent manner [6–9,21]. In the human testis, SOAT expression was detected in very specific germ cell stages, including zygotene primary spermatocytes of stage V, pachytene spermatocytes of all stages (I–V), secondary spermatocytes of stage VI, and round spermatids (step 1 and step 2) of stages I and II [7], thus SOAT was assumed to participate in the regulation of spermatogenesis and fertility in man [1].

To test this assumption it was intended to identify naturally occurring and functionally defective genetic variants in the *SLC10A6* gene and to comparatively analyze their occurrence in patients with impaired spermatogenesis or infertility versus subjects with intact spermatogenesis. This project was initiated in 2012, where only six missense SOAT variants (S6F, I114V, R185T, I196T, V199I, and L204F) with minor allele frequencies of 0.1–26% were known from the GenBank SNP database. Among these variants, only SOAT L204F showed significantly impaired transport activity compared to SOAT-WT in a previous study [10]. However, as this variant was detected in subjects with intact spermatogenesis as well as in patients with hypospermatogenesis (quantitatively reduced, but qualitatively preserved spermatogenesis) with nearly identical allele frequencies, SOAT-L204F

cannot be regarded as causative for hypospermatogenesis [10]. However, this does not completely exclude a role of SOAT for male fertility and reproduction, as hypospermatogenesis is just one of several histomorphometric pathologies of the testis and, beyond that, SOAT-L204F had some residual transport activity left.

A second search on naturally occurring genetic variants in the *SLC10A6* gene was performed in 2015 and then revealed an increase to 350 hits, mostly fostered by the 1000 genomes project [22]. However, nearly all of them were classified as rare genetic variants with minor allele frequencies of 0.0008–1.1%, what would hamper any genetic association study. Nevertheless, it was regarded to be worth to functionally characterize these novel SOAT variants. Due to the high number of 31 genetic variants to be analyzed in the present study, it was necessary to establish a larger scale protocol as before in order to analyze transport function, plasma membrane expression, and total SOAT protein expression in transfected HEK293 cells. This required the use of an N-terminally HA-tagged SOAT protein, what can be regarded as a limitation as it does not exclude the possibility that the polymorphic HA-SOAT variants would behave differently in an untagged form. As a further limitation, it was not possible to measure transport kinetics for all of the SOAT variants as this would have required to establish stably transfected cells for each variant. Furthermore, only DHEAS was used as a reference substrate and the obtained DHEAS transport data cannot automatically be transferred to all other substrates of SOAT.

Considering these limitations, we found that nearly all SOAT variants had significantly reduced transport activity for DHEAS, and many of them were completely transport negative after being transiently transfected into HEK293 cells. In contrast, plasma membrane expression was more rarely impaired and only occurred for few SOAT variants. As reduced expression at the plasma membrane also has a

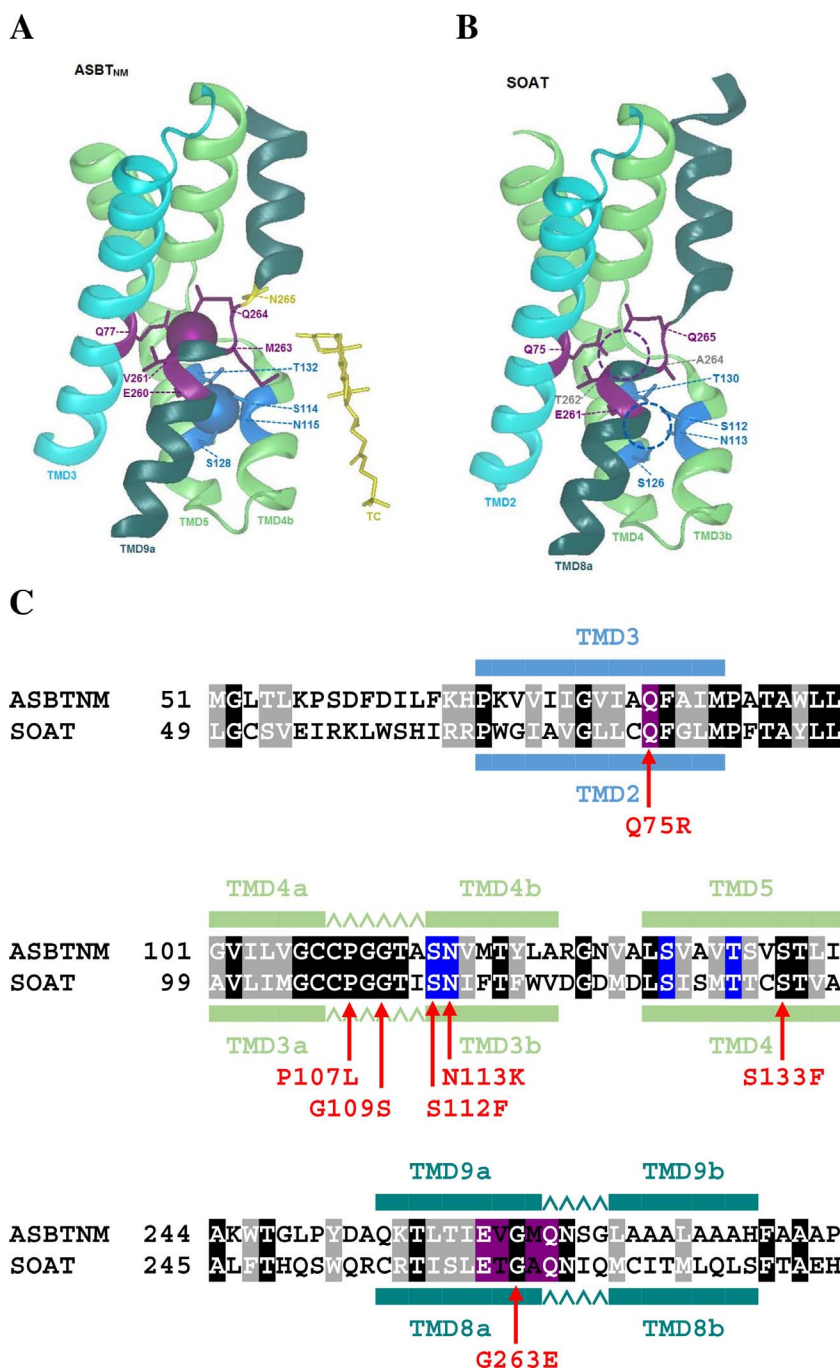


Fig. 4. Most of the loss-of-function SOAT variants are located close to the supposed sodium-binding sites of SOAT.

Detailed view on the sodium-binding sites in the ASBT_{NM} structure and the SOAT homology model. (A) In ASBT_{NM} the first Na⁺ ion (blue) is coordinated by S114, N115 of TMD4, S128 and T132 of TMD5, and E260 of TMD9. E260, V261, M263, and Q264 of TMD9 as well as Q77 of TMD3 interact with the second Na⁺ (purple). N265 of TMD9 is involved in binding of the substrate taurocholate (yellow). (B) In the human SOAT protein all of these amino acids are conserved, except for V261 and M263. (C) Sequence alignment of ASBT_{NM} and SOAT. Based on the SOAT homology model, S112 and N113 of TMD3, S126 and T130 of TMD4, as well as E261 of TMD8 are supposed to bind the first Na⁺, whereas E261 and Q265 of TMD8 as well as Q75 of TMD2 probably interact with the second Na⁺.

negative effect on the transport rate, but impaired transport does not necessarily affect plasma membrane expression, it was decided to categorize the effects of plasma membrane expression and transport activity in different categories. In total, five genetic variants revealed impaired expression at the plasma membrane and reached only < 50% membrane expression compared to HA-SOAT-WT, being A83V, P107L, G241D, G263E, and Y308N. Closer analysis of these variants within the SOAT homology model revealed that most of them are located more in the periphery of the core domain (Fig. 3). It was proposed that the transport mechanism of the SLC10 carriers is based on alternating conformational transitions of the substrate binding side allowing access of the substrate from one side of the membrane or the other. During this conformational transition the panel domain seems to be more flexible than the core domain [23,24]. Therefore, homo-dimerization, which occurs during the sorting process of the SOAT protein to the plasma

membrane [25], more likely occurs at the more rigid core domain. As a speculation, the variants of category 3 might induce conformational changes which affect homo-dimerization of SOAT and thereby also plasma membrane trafficking. This was also suggested for the L204F SOAT variant, which showed an identical K_m value for the transport of DHEAS compared with SOAT-WT, but had significantly reduced V_{max} transport rates due to insufficient trafficking to the plasma membrane [10]. The variant SOAT-Y308N is located directly at the transition from TMD9 to the C-terminus. This amino acid position was also striking in a previous mutagenesis study on human ASBT [26]. This study investigated an ASBT-Y308C mutant and also found significantly reduced cell surface expression and abolished transport activity, suggesting an essential role of this amino acid position for proper plasma membrane sorting in both carriers, ASBT and SOAT.

Most of the variants of category 2b are located directly at or closely

		TMD1	
SOAT-WT	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt474 (del1)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt474 (insG)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt665 (del10)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt828 (del1)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt1024 (del1)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt1033 (del2)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS
nt1113 (insA)	1	MRANCSSSSACPANSSEEELPVGLEVHGNLELVFTVV	STVMMGLLMFSLGCSVEIRKLWS

		TMD2		TMD3	
SOAT-WT	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
nt474 (del1)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPG apsl tfpsqglm
nt474 (insG)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPG hhl .
nt665 (del10)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
nt828 (del1)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
nt1024 (del1)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
nt1033 (del2)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD
nt1113 (insA)	61	HIRRFWGI	AVGLLCQFGLMPFTAYLLAISFSLK	PVQAI	AVLIMGCCPGGTISNIFTFWVD

		TMD4		TMD5	
SOAT-WT	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCLTIPVAFGV		
nt474 (del1)	121	ei wisav.			
nt665 (del10)	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCL wplvsm .		
nt828 (del1)	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCLTIPVAFGV		
nt1024 (del1)	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCLTIPVAFGV		
nt1033 (del2)	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCLTIPVAFGV		
nt1113 (insA)	121	GDMDLSISMTTCSTVAALGMMPLCIYLYTWSWSLQQLTIPYQ	NIGITLVCLTIPVAFGV		

		TMD6		TMD7	
SOAT-WT	181	YVNYRWP	KQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKGSWNSDITLLT	ISFIFPLIGHVT	
nt828 (del1)	181	YVNYRWP	KQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKGSWNSDITLLT	rpsvssfl .	
nt1024 (del1)	181	YVNYRWP	KQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKGSWNSDITLLT	ISFIFPLIGHVT	
nt1033 (del2)	181	YVNYRWP	KQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKGSWNSDITLLT	ISFIFPLIGHVT	
nt1113 (insA)	181	YVNYRWP	KQSKIILKIGAVVGGVLLLVAVAGVVLAKGSWNSDITLLT	ISFIFPLIGHVT	

		TMD8		TMD9	
SOAT-WT	241	GFLLLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTA	EHLVQMLSFPPLAYGLFQLID		
nt1024 (del1)	241	GFLLLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTA	EHLVQMLSFPPLA mdsss .		
nt1033 (del2)	241	GFLLLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTA	EHLVQMLSFPPLAYGL padrw		
nt1113 (insA)	241	GFLLLALFTHQSWQRCRTISLETGAQNIQMCITMLQLSFTA	EHLVQMLSFPPLAYGLFQLID		

SOAT-WT	301	GFLIVAAYQTYKRRLKKNKHGKNSGCTEVCHTRKSTSSRETNAFLEVNEEGAITPGPPGP
nt1033 (del2)	301	isyccsisdvqeeieeqtwkkelrlhrslpyeeidffqrdqcll gge.
nt1113 (insA)	301	GFLIVAAYQTYKRRLKKNKHGK elrlhrslpyeeidffqrdqcll gge.

SOAT-WT	361	MDCHRALEPVGHITSCE.
---------	-----	--------------------

Fig. 5. Most of the SOAT frameshift variants are highly truncated.

Based on the insertions and deletions in the *SLC10A6* gene, *in silico* translation was performed in order to predict the truncated SOAT proteins. Off-frame coded amino acids are depicted in red small letters, whereas the SOAT-WT sequence is given in capital black letters. Localization of the transmembrane domains, based on the 3D homology model of SOAT (Fig. 3), is indicated.

to the supposed sodium-binding sites of SOAT. This is particularly true for the variants with completely abolished transport function, namely G109S, S112F, N113K, and S133F (Fig. 4). It is known from the crystal structures of ASBT_{NM} [15] and ASBT_{Yf} [16] that certain highly conserved amino acids are involved in the binding of the two Na⁺ ions during the transport cycle (Fig. 4A). Most of these amino acids except for V261 and M263 are highly conserved among the SLC10 carriers and are also present in SOAT at the corresponding positions (Fig. 4C). As some of the SOAT variants directly involve these amino acids, namely Q75R, S112F, and N113K, and others are in close proximity to these

sodium-binding domains, being P107L, G109S, S133F, and G263E, it is most likely that these variants affect the SOAT transport activity by hindering Na⁺ from its binding at the respective binding sites (Fig. 4B). Further evidence for the critical role of amino acids in close proximity to the sodium-binding sites for the transport function come from mutagenesis studies on ASBT and NTCP. As an example, in rat Ntcp E257Q mutation (corresponding to E260 in ASBT_{NM} and E261 in SOAT) completely abolished transport function for taurocholate, but kept the plasma membrane expression unaffected [27]. Furthermore, T262M mutation of ASBT (corresponding to V261 in ASBT_{NM} and T262 in

SOAT) had the same negative effect on the transport function without affecting cell surface expression of the protein [28]. In this case, T262M represents a naturally occurring variant that is correlated with primary bile acid malabsorption (PBAM), an idiopathic intestinal disorder [28]. S133F is a further SOAT variant that abolished DHEAS transport activity. At this position in the mouse *Asbt*, S133A mutation also impaired the bile acid transport activity in a previous study [29].

As anticipated, all frameshift variants, except of nt1113(InsA), completely abolished the transport function of SOAT. This is most likely due to truncation of structurally or functionally important domains. Furthermore, the off-frame amino acids produced by the frame shift might have a direct negative effect on the transport function. Closer analysis of nt1113(InsA) revealed that this mutant covers the SOAT-WT sequence up the first quarter of the C-terminus (Fig. 5). Only the last 55 C-terminal amino acids are deleted and replaced by 26 off-frame amino acids. This truncation/mutation leads to impaired plasma membrane expression of the protein, suggesting that the C-terminus of the SOAT protein is involved in the trafficking to the plasma membrane. Nevertheless, this mutant maintained some residual transport activity for DHEAS, indicating that a correctly sorted fraction might still be transport active. This would mean that the C-terminus of SOAT is involved in the sorting process rather than the transport cycle of this carrier.

Among all variants analyzed, only M140I and S151F showed transport activity and cell surface expression comparable to SOAT-WT. Therefore, M140 and S151 might be important neither for the sorting process nor for the transport cycle at all, or the amino acid exchanges M140I and S151F do not negatively affect these functions. Both residues are located at TMD5, which needs some flexibility when the conformational switch between the core domain and the panel domain occurs during the transport cycle [23,24]. Therefore, these amino acid substitutions might be tolerated.

Conclusion

SOAT is supposed to be involved in the regulation of spermatogenesis and male fertility. In the present study, the *SLC10A6* gene was analyzed for rare genetic variants, which might affect transport function or membrane expression of SOAT. Among the 31 SOAT variants analyzed, L44P, Q75R, P107L, G109S, S112F, N113K, S133F, G241D, G263E, G294R, and Y308N showed no transport activity for DHEAS at all. In the case of P107L, G241D, G263E, and Y308N, this was most likely due to significantly reduced expression in the plasma membrane. Other variants are located directly at (Q75R, S112F, N113K) or close to (G109S, S133F, and G263E) the supposed SOAT Na⁺ binding sites and thus could disable the sodium-coupled transport cycle. If these loss-of-function SOAT variants are more frequent in men with impaired spermatogenesis or infertility needs further investigation.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Group FOR1369 “Sulfated Steroids in Reproduction”, grant GE1921/4-1/2 to JG. The authors thank Anita Neubauer and Regina Leidolf for their technical assistance as well as Dr. Katharina Bakhaus for providing the HA-SOAT-WT construct.

References

- [1] J. Geyer, K. Bakhaus, R. Bernhardt, C. Blaschka, Y. Dezhkam, D. Fietz, G. Grosser, K. Hartmann, M.F. Hartmann, J. Neunzig, D. Papadopoulos, A. Sánchez-Guijo, G. Scheiner-Bobis, G. Schuler, M. Shihan, C. Wrenzycki, S.A. Wudy, M. Bergmann, The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes. Concept and review paper of the DFG research group FOR 1369 Sulfated Steroids in Reproduction, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 172 (2017) 207–221, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2016.07.002>.
- [2] J.W. Müller, L.C. Gilligan, J. Idkowiak, W. Arlt, P.A. Foster, The regulation of steroid action by sulfation and desulfation, *Endocr. Rev.* 36 (2015) 526–563.
- [3] C.A. Strott, Sulfonation and molecular action, *Endocr. Rev.* 23 (2002) 703–732.
- [4] M.J. Reed, A. Purohit, L.W. Woo, S.P. Newman, B.V. Potter, Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition, *Endocr. Rev.* 26 (2005) 171–202.
- [5] F. Labrie, All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 145 (2015) 133–138.
- [6] J. Geyer, B. Döring, K. Meerkamp, B. Ugele, N. Bakhiya, C.F. Fernandes, J.R. Godoy, H.R. Glatt, E. Petzinger, Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6), *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19728–19741.
- [7] D. Fietz, K. Bakhaus, B. Wapelhorst, G. Grosser, S. Günther, J. Alber, B. Döring, S. Kliesch, W. Weidner, C.E. Galuska, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, M. Bergmann, J. Geyer, Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis—cellular localization, expression pattern and functional analysis, *PLoS One* 8 (5) (2013) e62638.
- [8] C.E. Galuska, M.F. Hartmann, A. Sánchez-Guijo, K. Bakhaus, J. Geyer, G. Schuler, K.P. Zimmer, S.A. Wudy, Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS), *Analyst* 138 (2013) 3792–3801.
- [9] H. Schweigmann, A. Sánchez-Guijo, B. Ugele, K. Hartmann, M.F. Hartmann, M. Bergmann, C. Pfarrer, B. Döring, S.A. Wudy, E. Petzinger, J. Geyer, G. Grosser, Transport of the placental estriol precursor 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and Ntcp-HEK293 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 259–265.
- [10] K. Bakhaus, D. Fietz, S. Kliesch, W. Weidner, M. Bergmann, J. Geyer, The polymorphism L204F affects transport and membrane expression of the sodium-dependent organic anion transporter SOAT (SLC10A6), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2017.09.017> in press.
- [11] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede, The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22 (2006) 195–201.
- [12] F. Kiefer, K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, T. Schwede, The swiss-model repository and associated resources, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D387–D392.
- [13] N. Guex, M.C. Peitsch, T. Schwede, Automated comparative protein structure modeling with swiss-model and swiss-pdbviewer: a historical perspective, *Electrophoresis* 30 (2009) S162–S173.
- [14] M. Biasini, S. Bienert, A. Waterhouse, K. Arnold, G. Studer, T. Schmidt, F. Kiefer, T.G. Cassarino, M. Bertoni, L. Bordoli, T. Schwede, SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) W252–W258.
- [15] N.J. Hu, S. Iwata, A.D. Cameron, D. Drew, Crystal structure of a bacterial homologue of the bile acid sodium symporter ASBT, *Nature* 478 (2011) 408–411.
- [16] X. Zhou, E.J. Levin, Y. Pan, J.G. McCoy, R. Sharma, B. Kloss, R. Bruni, M. Quick, M. Zhou, Structural basis of the alternating-access mechanisms in a bile acid transporter, *Nature* 505 (2014) 569–573.
- [17] A. Ruokonen, T. Laatikainen, E.A. Laitinen, R. Vihko, Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue, *Biochemistry* 11 (1972) 1411–1416.
- [18] A. Ruokonen, Steroid metabolism in testis tissue: the metabolism of pregnenolone, pregnenolone sulfate, dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in human and boar testes in vitro, *J. Steroid Biochem.* 9 (1978) 939–946.
- [19] A.H. Payne, R.B. Jaffe, Comparative roles of dehydroepiandrosterone sulfate and androstenediol sulfate as precursors of testicular androgens, *Endocrinology* 87 (1970) 316–322.
- [20] A.H. Payne, R.B. Jaffe, Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes, *J. Clin. Endocr. Metab.* 40 (1975) 102–107.
- [21] J. Geyer, J.R. Godoy, E. Petzinger, Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 300–306.
- [22] The 1000 Genomes Project Consortium, A global reference for human genetic variation, *Nature* 526 (2015) 68–74.
- [23] R. Alhadeff, A. Ganoth, I. Arkin, Mechanistic studies of the apical sodium-dependent bile acid transporter, *Proteins* 83 (2015) 1107–1117.
- [24] D. Drew, O. Boudker, Shared molecular mechanisms of membrane transporters, *Annu. Rev. Biochem.* 85 (2016) 534–572.
- [25] I.T.G.W. Bijlsmans, R.A.M. Bouwmeester, J. Geyer, K.N. Faber, S.F.J. van de Graaf, Homo- and heterodimeric architecture of the human liver Na⁺-dependent taurocholate cotransporting protein Ntcp, *Biochem. J.* 441 (2012) 1007–1015.
- [26] N. Hussainzoda, A. Banerjee, P.W. Swaan, Transmembrane domain VII of the human apical sodium-dependent bile acid transporter ASBT (SLC10A2) lines the substrate translocation pathway, *Mol. Pharmacol.* 70 (2006) 1565–1574.
- [27] D. Zahner, U. Eckhardt, E. Petzinger, Transport of taurocholate by mutants of negatively charged amino acids, cysteines, and threonines of the rat liver sodium-dependent taurocholate cotransporting polypeptide Ntcp, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 1117–1127.
- [28] P. Oelkers, L.C. Kirby, J.E. Heubi, P.A. Dawson, Primary bile acid malabsorption caused by mutations in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene (SLC10A2), *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 1880–1887.
- [29] T. Saeki, S. Mizushima, K. Ueda, K. Iwami, R. Kanamoto, Mutational analysis of uncharged polar residues and proline in the distal one-third (Thr¹³⁰-Pro¹⁴²) of the highly conserved region of mouse *Slc10a2*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 1535–1540.

PUBLIKATION #3

Bakhaus, K., Bennien, J., Fietz, D., Sánchez-Guijo, A., Hartmann, M., Serafini, R., Love, C.C., Golovko, A., Wudy, S.A., Bergmann, M., Geyer, J. (2018):
„Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate“

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 179 (2018) 45-54

[doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.07.019](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019)

(Authors in bold equally contributed)



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Sodium-dependent organic anion transporter (*Slc10a6*^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate

Katharina Bakhaus^{a,1}, Josefine Bennien^{a,1}, Daniela Fietz^b, Alberto Sánchez-Guijo^c,
 Michaela Hartmann^c, Rosanna Serafini^d, Charles C. Love^d, Andrei Golovko^e, Stefan A. Wudy^c,
 Martin Bergmann^b, Joachim Geyer^{a,*}

^a Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany

^b Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany

^c Steroid Research and Mass Spectrometry Unit, Pediatric Endocrinology and Diabetology, Center of Child and Adolescent Medicine, Justus Liebig University Giessen, Germany

^d Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A & M University, TX, USA

^e Texas A & M Institute for Genomic Medicine, TX, USA

ARTICLE INFO

Keywords:

Soat
 Slc10a6
 Knockout mouse
 Sulfated steroids
 Reproduction
 Transport
 Cholesterol sulfate
 Testis

ABSTRACT

The sodium-dependent organic anion transporter SOAT (gene name *SLC10A6* in man and *Slc10a6* in mice) is a plasma membrane transporter for sulfated steroids, which is highly expressed in germ cells of the testis. SOAT can transport biologically inactive sulfated steroids into specific target cells, where they can be reactivated by the steroid sulfatase (STS) to biologically active, unconjugated steroids known to regulate spermatogenesis. Significantly reduced SOAT mRNA expression was previously found in different forms of impaired spermatogenesis in man. It was supposed that SOAT plays a role for the local supply of steroids in the testis and consequently for spermatogenesis and fertility. Thus, an *Slc10a6*^{-/-} Soat knockout mouse model was established by recombination-based target deletion of the *Slc10a6* gene to elucidate the role of Soat in reproduction. However, the *Slc10a6*^{-/-} knockout mice were fertile, produced normal litter sizes, and had normal spermatogenesis and sperm vitality. This phenotype suggests that the loss of Soat can be compensated in the knockout mice or that Soat function is not essential for reproduction. In addition to reproductive phenotyping, a comprehensive targeted steroid analysis including a set of 9 un-conjugated and 12 sulfo-conjugated steroids was performed in serum of *Slc10a6*^{-/-} knockout and *Slc10a6*^{+/+} wildtype mice. Only cholesterol sulfate, corticosterone, and testosterone (only in the males) could be detected in considerable amounts. Interestingly, male *Slc10a6*^{-/-} knockout mice showed significantly higher serum levels for cholesterol sulfate compared to their wildtype controls. As cholesterol sulfate has a broader impact apart from the testis, further analysis of this phenotype will include other organs such as skin and lung, which also show high Soat expression in the mouse.

1. Introduction

The sodium-dependent organic anion transporter (SOAT in man and Soat in mice) represents a plasma membrane uptake carrier for sulfated

steroid hormones and belongs to the solute carrier family 10 (member *SLC10A6* in man and *Slc10a6* in mice) [1]. SOAT shows transport activity for estrone sulfate (E₁S), estradiol sulfate (E₂S), pregnenolone sulfate (PregS), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), 16α-

Abbreviations: 4A, 4-androstenedione; AD, androstanediol; AnDiolS, androstenediol sulfate; AnS, androsterone sulfate; CASA, computer-assisted sperm analysis; CS, cholesterol sulfate; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; DHT, dihydrotestosterone; DHTS, dihydrotestosterone sulfate; epiAnS, epiandrosterone sulfate; ES cells, embryonic stem cells; eTS, epitestosterone sulfate; E₁S, estrone sulfate; E₂S, estradiol sulfate; GC, gas chromatography; het, heterozygous; IS, internal standard; ko, knockout; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; 16α-OH-DHEAS, 16α-hydroxydehydroepiandrosterone sulfate; 17-OH-PregS, 17-hydroxypregnenolone sulfate; 17-OH-Prog, 17-hydroxyprogesterone; PBS, phosphate-buffered saline; PregS, pregnenolone sulfate; Prog, progesterone; SCO, Sertoli cell only; SOAT, sodium-dependent organic anion transporter; STS, steroid sulfatase; T, testosterone; TS, testosterone sulfate; wt, wildtype

* Corresponding author at: Institute of Pharmacology and Toxicology, Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Schubertstr. 81, 35392 Giessen, Germany.

E-mail address: Joachim.M.Geyer@vetmed.uni-giessen.de (J. Geyer).

¹ Equally contributed.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019>

Received 8 May 2017; Accepted 18 July 2017

Available online 22 July 2017

0960-0760/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

hydroxydehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS), and androstenediol sulfate (AnDiols). However, SOAT does not accept other steroid compounds as substrates including bile acids such as taurocholic acid and chenodeoxycholic acid, cardiac glycosides such as ouabain and digoxin, or steroid glucuronides such as estrone-3 β -D-glucuronide and estradiol-17 β -D-glucuronide [2–6]. Therefore, SOAT/Soat, in contrast to other more multi-specific carriers from the organic anion transporting polypeptide (OATP) or organic anion transporter (OAT) families, represents a specific steroid sulfate uptake carrier [7,8]. In man, SOAT is predominantly expressed in the testis and was also detected in skin, placenta, pancreas, and mammary gland [3,5]. In mice, Soat showed the highest expression in lung, skin and testis, the order of which depends on the mouse strain analyzed (CF-1, C57BL/6, FVB, or 129Sv) [9]. In both species, the SOAT/Soat protein was localized to spermatocytes and spermatids, supposing that this carrier fulfills similar functions in the testes of man and mouse. Sulfated steroid hormones require uptake carriers such as SOAT/Soat to enter cells, where these molecules, after cleavage by the steroid sulfatase (STS), participate in the overall endocrine regulation via androgen and estrogen receptors [8,10–12]. In order to elucidate Soat's role for spermatogenesis and male fertility in vivo, an *Slc10a6*^{-/-} knockout (ko) mouse model was established and analyzed regarding its reproductive phenotype and steroid profile.

2. Material and methods

2.1. Materials

All chemicals, unless otherwise stated, were obtained from Sigma-Aldrich.

2.2. Generation of *Slc10a6*^{-/-} knockout mice

Slc10a6^{-/-} ko mice were acquired from the Texas A & M Institute of Genomics Medicine (TIGM, Texas, USA). The *Slc10a6*^{-/-} mouse line was generated by homologous recombination-based target deletion of the coding exons 2 and 3 of the *Slc10a6* gene in 129SvEvBrd-derived embryonic stem (ES) cells using a targeting vector designed to replace these exons with a selection cassette containing the *neo* and *LacZ* genes (Fig. 1A). Homologous recombination was verified by Southern blot analysis with a 3' internal probe corresponding to the targeting vector and a 5' external probe outside the recombination site (data not shown). Selected recombinant ES cells were injected into blastocysts and implanted into a C57BL/6 breeder mouse. Progeny were genotyped by PCR and heterozygous (het) mice were used for repeated backcrossing onto purebred C57BL/6N mice. The backcrossing procedure was guided by SNP-based *Speed Congenics* (1450 MD Linkage SNP panel, Taconic) in order to select heterozygous knockouts with the most C57BL/6N character for further backcrossing. *Speed Congenics* is based on SNP analysis across 19 autosomes and the X chromosome known to be polymorphic between the donor (129SvEvBrd) and recipient (C57BL/6NTac) strains [13]. After two years of backcrossing, we obtained *Slc10a6*^{+/-} het mice with a well-defined 99.51% C57BL/6N recipient genome, representing generation equivalent NE7 [14]. If not otherwise stated, het male and female *Slc10a6*^{+/-} mice were mated to generate *Slc10a6*^{-/-} homozygous ko and *Slc10a6*^{+/+} wildtype (wt) littermate control mice. During the whole mating process, the progeny genotype numbers were close to the expected Mendelian ratios.

2.3. Genotyping of the *Slc10a6* ko mice by multiplex PCR and allelic discrimination

Mouse genomic DNA was isolated from earmarks following the *QIAamp DNA Kit* (Qiagen) protocol. Briefly, tissue samples were thoroughly mixed with 180 μ l *ATL buffer* and 20 μ l protein kinase K and incubated for 3–12 h at 56 °C in a thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

Afterwards, 200 μ l *AL buffer* was added and samples were vortexed for 15 s followed by an incubation step at 70 °C for 10 min. Subsequently, 200 μ l ethanol were added and samples were vortexed for 15 s. The whole sample volume was transferred to a *QIAamp DNA Mini Column*, centrifuged for 1 min at 8,000 rpm, and subsequently washed with *buffers AW1* and *AW2*. Next, DNA was eluted with 200 μ l ddH₂O. To distinguish between *Slc10a6*^{+/+} wt, *Slc10a6*^{+/-} het and *Slc10a6*^{-/-} ko mice, multiplex PCR was performed (Fig. 1B). Primers (obtained from Metabion International) are listed in Table 1.

For multiplex PCR, the following components were used: 1 μ l of DNA, 2 μ l 10 \times *Dream Taq buffer*, 2 μ l dNTP mix (2 mM each), 1 μ l of each primer at 10 pmol, 0.1 μ l *Dream Taq polymerase* (Thermo Fisher Scientific), and ddH₂O to a final volume of 20 μ l. PCR conditions were 1 \times 95 °C for 3 min, 35 \times (95 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 60 s), and final extension at 72 °C for 5 min. PCR products were separated on a 1.5% agarose gel and visualized by *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium). Genotyping data were verified by allelic discrimination for SNP rs13478433 (Table 2).

This SNP lies in direct proximity to the *Slc10a6* gene on chromosome 5 and is derived from the 129SvEvBrd donor strain (Suppl. Table 1). For allelic discrimination, the fluorogenic 5' nuclease *TaqMan assay M_22549783_10* (Applied Biosystems) was used including a C-allele-specific VIC-coupled probe corresponding to the C57BL/6N recipient strain and a T-allele-specific FAM-coupled probe detecting the 129SvEvBrd strain used for targeted deletion. Real-time PCR amplification was performed in a total reaction volume of 25 μ l consisting of 12.5 μ l *TaqMan Genotyping Master Mix* (Applied Biosystems), including *AmpliTaq Gold DNA polymerase*, dNTP mix, reaction buffer and ROX reference dye, 2.5 μ l *TaqMan AD assay* (Applied Biosystems) and about 100 ng of genomic DNA. The samples were amplified in a 96-well optical plate on an *Applied Biosystems 7300 thermal cycler*. The amplification reaction started with the activation of the *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* at 95 °C for 10 min before 40 cycles of 92 °C \times 15 s and 60 °C \times 30 s were applied. Following amplification, allelic discrimination was recorded on the post-PCR products and analyzed by the *7300 Real-Time PCR System Sequence Detection Software (SDS) v1.4* (Applied Biosystems).

2.4. Sample preparation from mouse organs

All mice were housed in a specific pathogen-free animal facility with a temperature controlled environment and 12-h light/dark cycle and were provided with standard laboratory food and water ad libitum. All experiments, including euthanasia and tissue preparations, were approved by the local regulatory authority (Regierungspräsidium Gießen) with the reference number V54-19 c 20 15 h 02 GI 20/23 Nr. A8/2013. Organ samples were obtained from *Slc10a6* wt and ko mice after deep anesthesia with ketamine (120 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) and exsanguination via heart puncture. Organs were immediately removed and processed for RNA isolation or immunofluorescence analysis. Blood samples were stored for 3 h at room temperature before samples were centrifuged for 20 min at 3,000 rpm. Serum was stored at -20 °C and used for steroid profiling.

2.5. RNA preparation and quantitative real-time PCR expression analysis

For RNA isolation, organs were conserved in *RNAlater* solution (Thermo Fisher Scientific) at -20 °C before total RNA was extracted using *TRI reagent* (Invitrogen). The RNA amount was determined using the *Qubit 3.0 fluorometer* (Invitrogen). The RNA integrity number (RIN) was determined by the *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) using the *Agilent RNA 6000 Nano Kit* according to the manufacturer's instructions. Only RNA samples with RIN values of ≥ 8.5 were used for subsequent cDNA synthesis and quantitative real-time PCR analysis. The cDNA was synthesized using *SuperScript III First Strand Synthesis* (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with a

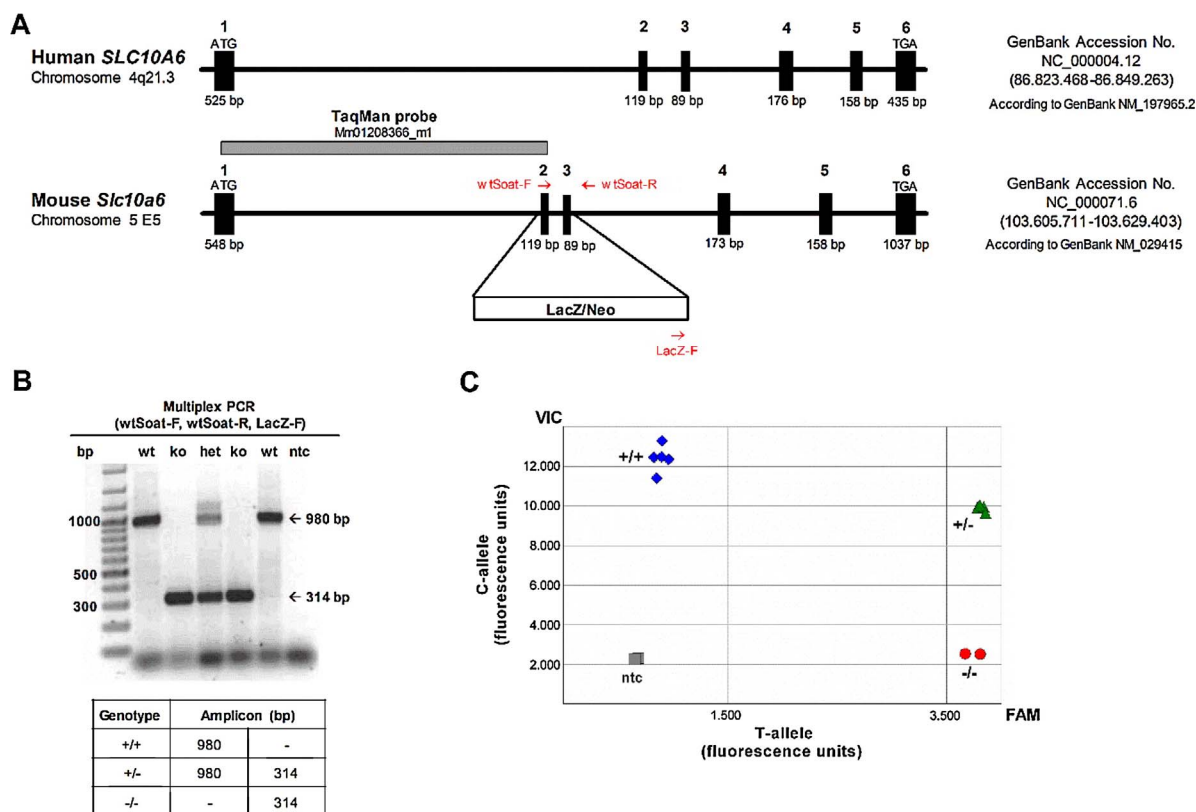


Fig. 1. Target deletion of the murine *Slc10a6* gene and genotyping.

(A) The mouse *Slc10a6* and human *SLC10A6* genes both consist of six coding exons and are located at chromosome 5 E5 and 4q21.3, respectively. Black boxes depict the exons and are in sense of broadness and distance scaled to the *SLC10A6/Slc10a6* genes. *Slc10a6* ko mice were generated by target deletion of the coding exons 2 and 3 in 129SvEvBrd-derived embryonic stem cells and integration of a *LacZ/Neo* selection cassette at the site of recombination. Arrows indicate the localization of the primers used for genotyping. (B) For genotyping, genomic DNA of *Slc10a6* wt, het, and ko mice was isolated from earmarks. Multiplex PCR analysis detected genotype-specific bands for the wt (980 bp) and mutant (314 bp) alleles on a 1.5% agarose gel. (C) SNP-specific probes labeled with VIC for the C57BL/6N strain (C-allele representing wt) and FAM for the 129SvEvBrd strain (T-allele representing ko) were used for quantitative real-time PCR of genomic DNA from *Slc10a6* wt and ko mice. An additional fluorescence read was performed on the post-PCR samples and allelic discrimination was done by automatic allele calling. Determination of the *Slc10a6* genotype is based on the gain of fluorescence of only FAM (–/–), only VIC (+/+), or both dyes (+/-), and was used to validate the PCR-based genotyping.

Table 1

Primers used for genotyping and expression analysis.

Primer	Sequence (5' → 3')
wtSoat-F	GCC TCT CTG CCT CTA CAT CTA CAC CCG
LacZ-F	CIT CTT GAC GAG TTC TTC TGA GGG GAT
wtSoat-R	CCT AGT GTT TCG GTC TCT TTC AGC ATC

preceding *DNase* I treatment in order to eliminate remaining DNA. For quantitative real-time PCR amplification of the mouse *Soat* transcript, the *TaqMan Gene Expression Assay* Mm01208366_m1 (Thermo Fisher Scientific) was applied (Fig. 1A). Amplification of the murine hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*mHprt*) transcript (assay number Mm00446968_m1) was used as endogenous control. For each specimen, triplicate determinations were performed in a 96-well optical well plate using 5 μ l cDNA, 1.25 μ l *TaqMan Gene Expression Assay*, 12.5 μ l *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) and ddH₂O to a final volume of 25 μ l. Quantitative real-time PCR was performed as described above.

2.6. Histomorphological evaluation of the testes from *Slc10a6* wt and ko mice

For histomorphometry, one testis of each *Slc10a6* wt (n = 7) and ko (n = 9) mouse was directly stored in Bouin's solution (70% picric acid, 23.3% formalin, 5% glacial acetic acid) for 24 h, embedded in paraffin and cut in 5 μ m thick sections. Sections were stained with hematoxylin

Table 2

SNPs flanking the target deleted *Slc10a6* gene.

Strain	SNP	Chr.	Position
C57BL/6N	↑	↑	↑
	mCV22996021	5	75065363
129S6/SvEvBrd	rs13478337	5	76181811
	rs13478352	5	79902641
	rs3721607	5	81282125
	rs3667334	5	81819770
	rs13459087	5	85884364
	CEL-5_87173557	5	87173557
	gnf05.084.686	5	88364567
	rs3673049	5	88498569
	rs13478388	5	89674255
	rs6232866	5	90936845
	rs13478402	5	93496397
	CEL-5_93945748	5	93945748
	rs3661241	5	95154383
	rs3705458	5	96618852
	rs13478433	5	101291108
	<i>Slc10a6</i> (target deletion)	5	103605711–103629403
C57BL/6N	rs13478451	5	106102700
	↓	↓	↓

Note: Repeated backcrossing onto purebred C57BL/6N mice revealed congenic *Slc10a6*^{-/-} knockout mice with only a 27 Mbp region linked to the target deleted *Slc10a6* gene and derived from the 129S6/SvEvBrd background. The SNP rs13478433 (bold) was linked to the *Slc10a6* gene and was used for allelic discrimination of the *Slc10a6*^{+/+} wt, *Slc10a6*^{+/-} het, and *Slc10a6*^{-/-} ko mice by fluorogenic 5'nuclease TaqMan AD analysis (see Fig. 1C).

and eosin according to standard protocols. Between 150 and 300 tubular cross sections were counted per genotype. Staging of spermatogenesis was performed according to [15]. Three different spermatogenic stages were counted due to their relation to meiosis. In stage V, spermatogonia type B, which enter meiosis, appear for the first time. Stage VIII is defined as the stage of sperm release and the onset of meiosis, as preleptotene spermatocytes enter the prophase of meiosis I. In the last stage of the spermatogenic cycle, stage XII, the first meiotic division takes place. Moreover, seminiferous tubules with impaired spermatogenesis (e.g. germ cell aplasia also known as Sertoli cell only (SCO) syndrome, arrests of spermatogenesis, missing generations) were identified by microscopy on a Leica LM 750 microscope.

2.7. Immunofluorescence detection of the Soat protein

For immunofluorescence detection of the Soat protein, tissue samples were stored in 4% paraformaldehyde for 72 h before they were transferred into 30% sucrose dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4 , and 7.3 mM Na_2HPO_4 , at pH 7.4). After 24 h, tissue samples were embedded in *Tissue Tek* (Labor Weckert) and frozen at -80°C for 30 min before 8 μm thick cryosections were cut. For immunostaining, slides were thawed at room temperature for 15 min and rehydrated with PBS three times for 5 min followed by antigen retrieval using 0.1% SDS in PBS for 5 min. After three washing steps over 10 min with PBS, slides were incubated in blocking buffer (5% BSA in PBS) for 30 min at room temperature. The anti-mSoat₃₂₉₋₃₄₄ antibody (1:500 dilution) [9] was diluted in incubation buffer (1% goat serum, 0.1% Triton X-100 in PBS) and added to the slides over night at 4°C . Slides were washed with PBS three times for 5 min before the secondary antibody Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:800 dilution, Invitrogen) was applied for 1 h at room temperature. Slides were finally washed three times with PBS, mounted with *Vectashield H-1200 Mounting Medium* with DAPI (Vector Laboratories), and dried for 20 min at 4°C . Fluorescent imaging was performed on a Leica DM5500 B microscope and captured images were analyzed with the Leica Fluorescence Workstation software LAS AF 6000.

2.8. Sperm collection and computer-assisted sperm analysis (CASA)

Sperm analysis was performed at the Department of Large Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A & M University, Texas, USA. All procedures were approved in advance by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Texas A & M University. Sperm were collected from the cauda epididymis of sexually mature (> 8 weeks) mice. Each cauda was carefully trimmed to remove adipose and other tissue, rinsed in PBS and placed either in 1 ml *EmbryoMax HTF media* (Millipore) or in 1 ml *INRA 96 Extender* (Breeders Choice). Four to six cuts were made in each cauda using iris scissors, and sperm were released into the media by incubation for 10 min at 37°C under 5% CO_2 . After incubation, the tissue was removed and the suspension was mixed gently by swirling. The suspension was then diluted in the same medium to a concentration of $\sim 30 \times 10^6$ sperm/ml, equivalent to 750–1000 sperm per microscope field for CASA. Sperm concentration was measured with a fluorescence-based cell counter (NucleoCounter SP-100 TM ChemoMetec) and sperm motility was analyzed with a computer-assisted sperm motion analysis (CASMA) system (IVOS Version 12.2.1, Hamilton, Thorne Biosciences). Each sample (6 μl) was placed on a microscope slide (Leja Standard Count 2 Chamber slides) and slides were inserted into the CASMA. A minimum of 10 fields and 500 sperm were measured for each sample. Motility parameters included: percentage of total motile sperm (TMOT), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), mean curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN, $\mu\text{m/s}$), and percentage of

progressively motile sperm (PMOT). Sperm morphology was assessed in buffered formol saline solution and evaluated by differential-interference contrast microscopy (Olympus BX60). A total of 100 sperm per sample were evaluated and all abnormalities identified on each sperm were recorded. The following sperm morphologic features were identified: normal heads, abnormal heads, abnormal acrosomes, detached heads, proximal or distal cytoplasmic droplets, abnormal or bent mid-pieces, bent or coiled tails, and premature germ cells [16].

2.9. Mass spectrometric steroid determination in mouse serum

All reference steroids and the internal standards (ISs) were purchased from C/D/N Isotopes Inc. (Quebec, Canada), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Steraloids Inc. (Newport, USA), or from LGC Standards GmbH (Wesel, Germany). For steroid analysis, 300 μl mouse serum were mixed with 50 μl of a stable isotope-labeled internal standard (IS) cocktail for un-conjugated and sulfated steroids. Calibrators were prepared following the same procedure, using 300 μl of charcoal-stripped serum. Concentration of isotopic-labeled sulfated steroids was 1 $\mu\text{g/ml}$, with the exception of the IS for cholesterol sulfate (6 $\mu\text{g/ml}$), whereas the concentrations of un-conjugated steroids were 10 ng/ml for all the ISs, with the exception of the IS for DHEA, progesterone and corticosterone (50 ng/ml). After equilibration for 15 min at ambient temperature, proteins were precipitated and the samples were incubated for additional 15 min. Supernatants were isolated by centrifugation (14,600 rpm, 10 min) and mixed with 3 ml of water in a glass tube. Each sample was loaded onto an activated *Sep-Pak C18* cartridge. The cartridges were then washed with water (3 ml) and hexane (3 ml), respectively. Thereafter, un-conjugated steroids were eluted with chloroform (4 ml) and further worked up for GC-MS/MS analysis (see below). The next elution with methanol (4 ml) isolated sulfated steroids to be analyzed by LC-MS/MS. For LC-MS/MS analysis, methanol was evaporated and the samples were reconstituted in 250 μl of a solution containing 10% acetonitrile, 10% methanol, 70% water and 10% NH_3 (at 2.5%). Then, samples were vortexed and centrifuged before their injection into the LC-MS/MS instrument (10 μl).

The LC-MS/MS system consisted of an *Agilent 1200SL HPLC* (Waldbronn, Germany) with an *Accucore Phenyl-X* (100 \times 2.1 mm, 2.6 μm) column (Thermo Fisher Scientific). For separation of sulfated steroids, a gradient of a buffer solution with ammonium acetate (10 mM and pH 7 dissolved in 85% water and 15% acetonitrile) and a solution with organic solvents composed by 70% methanol and 30% acetonitrile (v/v) was used. MS/MS was performed on a *TSQ Quantum Ultra* triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) operated in electrospray negative ionization mode [17]. Limits of quantification were 1 ng/ml for PregS, 17-OH-PregS, E_1S , dihydrotestosterone sulfate (DHTS), testosterone sulfate (TS) and epitestosterone sulfate (eTS), 2.5 ng/ml for E_2S and AnDiolS, 10 ng/ml for androsterone sulfate (AnS) and epiandrosterone sulfate (epiAnS), 25 ng/ml for DHEAS and 80 ng/ml for cholesterol sulfate (CS). For GC-MS/MS analysis of un-conjugated steroids, the chloroform fraction from the *Sep-Pak* extraction was evaporated with a flow of nitrogen at 40°C , taken up in cyclohexane/ethanol (90:10 v/v) and purified by gel chromatography on 0.4 g *Sephadex LH-20* mini columns. For derivatization, heptafluorobutyric anhydride was used [18]. Gas chromatography (GC) was performed on an *Optima 1-MS* capillary column (25 m \times 0.2 mm I.D., df 0.1 μm , Macherey-Nagel, Germany) housed in an *Trace 1310* gas chromatograph with a *TriPlus RSH* auto-sampler coupled to a *TSQ 800* triple quadrupole MS (Thermo Fisher Scientific). Helium was used as carrier gas at 1.0 ml/min. The injector temperature was 270°C and the initial column temperature was set at 80°C . The steroids of interest eluted at a rate of $3^\circ\text{C}/\text{min}$ until the column temperature reached 242°C . The following MRM or m/z ratios were measured for the analytes and their corresponding internal standards: m/z 665.1 (668.1) for testosterone (T) (d3-T), m/z 482.2/482.2 (484.3/484.3) for 4-androstenedione (4A) (d2-4A), m/z 455.3/241.3 (458.3/244.4) for

androstenediol (AD) (d3-AD), m/z 270.2/121.1 (272.2/123.1) for DHEA (d2-DHEA), m/z 414.1/185.2 (417.2/188.2) for dihydrotestosterone (DHT) (d3-DHT), m/z 465.2/109.1 (469.1/113.1) for 17-OH-progesterone (17-OH-Prog) (d4-17-OH-Prog), m/z 465.2/109.1 (467.2/109.1) for 11-deoxycortisol (d2-11-deoxycortisol), 705.1/355.1 (712.1/359.2) for corticosterone (d8-corticosterone), and m/z 510.2/495.2 (/518.3/503.4) for progesterone (Prog) (d9-Prog). Limits of quantification were 0.04 ng/ml for T, AD, DHT and 11-deoxycortisol, 0.08 ng/ml for DHEA, 0.16 ng/ml for 4A and 17-OH-Prog, 0.21 ng/ml for Prog and 0.83 ng/ml for corticosterone.

3. Results

In order to explore the role of the SOAT/Soat for spermatogenesis and reproduction, an *Slc10a6* ko mouse model was established. In these mice, the coding exons 2 and 3 were replaced by a *LacZ/Neo* selection cassette, which could be verified by genotyping PCR with primers specific for the wt (wtSoat-F) and mutant (LacZ-F) allele together with a common reverse primer (wtSoat-R) (Fig. 1A). The primers wtSoat-F and wtSoat-R revealed a 980 bp fragment from the wt allele, whereas LacZ-F together with wtSoat-R produced an amplicon of 314 bp from the mutant allele. In the *Slc10a6*^{+/+} het mice, both amplicons of 314 bp and 980 bp were amplified (Fig. 1B). As the *Slc10a6* ko mouse derived from 129SvEvBrd ES cells, which were implanted into a C57BL/6N breeder mouse after injection into blastocysts, progeny were repeatedly backcrossed onto purebred C57BL/6N mice in order to obtain a congenic *Slc10a6* ko strain. Backcrossing was guided by SNP-based *Speed Congenics* and revealed het *Slc10a6*^{+/+} mice with a 99.51% C57BL/6N genome, only excluding a 27 Mbp region flanking the *Slc10a6* gene (position 76181811-103629403 on chromosome 5 E5), which still had 129SvEvBrd character (Table 2). In this region, 92 genes are located, but none of them has a strong functional correlation to reproduction (Suppl. Table 1). The SNP rs13478433, which allows discriminating between the C57BL/6N (C-allele) and 129SvEvBrd (T-allele) mice, was used to confirm PCR-based genotyping by allelic discrimination. Here, the rs13478433 C-allele indicated the C57BL/6N recipient genome, which is linked to the *Slc10a6* wt allele, whereas the 129SvEvBrd-specific rs13478433 T-allele indicated the target deleted *Slc10a6* ko allele (Fig. 1C).

In addition to the DNA level, the *Slc10a6* knockout was also verified on the mRNA and protein levels. Testis samples were analyzed by quantitative real-time PCR using an mSoat-specific *TaqMan* probe located on exon boundary 1/2 with the reverse primer located at the region of the target deletion in the mutant mice. In wt mice, testis

samples showed high *Soat* expression as expected, whereas in the *Slc10a6*^{-/-} ko mice, *Soat* mRNA was not detectable (Fig. 2A). Immunofluorescence studies on testis sections with the anti-*Soat*₃₂₉₋₃₄₄ antibody then also confirmed the absence of the *Soat* protein in the *Slc10a6*^{-/-} ko mice. *Soat*-specific immunoreactivity was detected in round spermatids (Fig. 2B) as described before [9]. In contrast, *Slc10a6*^{-/-} ko mice did not show any *Soat*-specific staining. In summary, *Slc10a6* knockout was confirmed at the DNA, RNA and protein levels.

For reproductive phenotyping, *Slc10a6*^{+/+} mice were used for het × het breeding to generate wt and ko littermates for further experiments. These mice were then set up for mating experiments to verify fertility of the *Slc10a6*^{-/-} ko mice. In total $n = 3$ wt × wt, $n = 7$ het × het, and $n = 12$ ko × ko matings were set up and the number of pups was recorded as well as their vitality, body weight and gender. All offspring mice were alive and without any obvious anatomical abnormalities, regardless of the respective genotype. There were no significant differences in the number of pups (Fig. 3A), infantile mortality, gender distribution (Fig. 3B), or body weight at the time of weaning (Fig. 3C) or in adult mice with an age older than 22 weeks (Fig. 3D) between *Slc10a6* wt, het and ko mice.

Because SOAT/Soat is highly expressed in testicular germ cells, the spermatogenesis of *Slc10a6* wt and ko mice was analyzed more closely. First, testis weights of *Slc10a6* wt and ko mice were determined and correlated to the body weight of each mouse. There was no statistically significant difference in the testis weights between the *Slc10a6* wt ($0.53 \pm 0.05\%$ of body weight) and ko mice ($0.63 \pm 0.12\%$ of body weight), but the testis weights of the *Slc10a6*^{-/-} mice tended to be higher (Fig. 4B). Furthermore, histomorphological analysis of testicular sections showed no significant changes in stage frequencies and duration of spermatogenesis between *Slc10a6* wt and ko mice (Fig. 4A). Stage V was counted in $12.85\% \pm 3.58$ (wt) and $12.74\% \pm 2.07$ (ko) of tubules, stage VIII in $22.15\% \pm 3.18$ (wt) and $20.64\% \pm 4.74$ (ko) of tubules and stage XII in $2.40\% \pm 1.42$ (wt) and $3.34\% \pm 2.36$ (ko) of tubules. The distribution of stages showed no significant difference between both genotypes (Fig. 4C). Impaired spermatogenesis, e.g. indicated by total loss of germ cells or arrested spermatogenesis (summarized here as “impairment” in Fig. 4C), occurred more frequent in *Slc10a6* ko mice ($3.96\% \pm 3.69\%$ of tubules) compared to wt mice ($1.34\% \pm 1.29\%$ of tubules), but without reaching the level of significance. Arrests of spermatogenesis were detected mostly at the level of primary spermatocytes, but showed no difference between *Slc10a6* wt and ko mice. Missing generations of germ cells ($2.59\% \pm 2.56\%$ ko vs. $0.79\% \pm 0.49\%$ wt) as well as total germ cell aplasia, also known

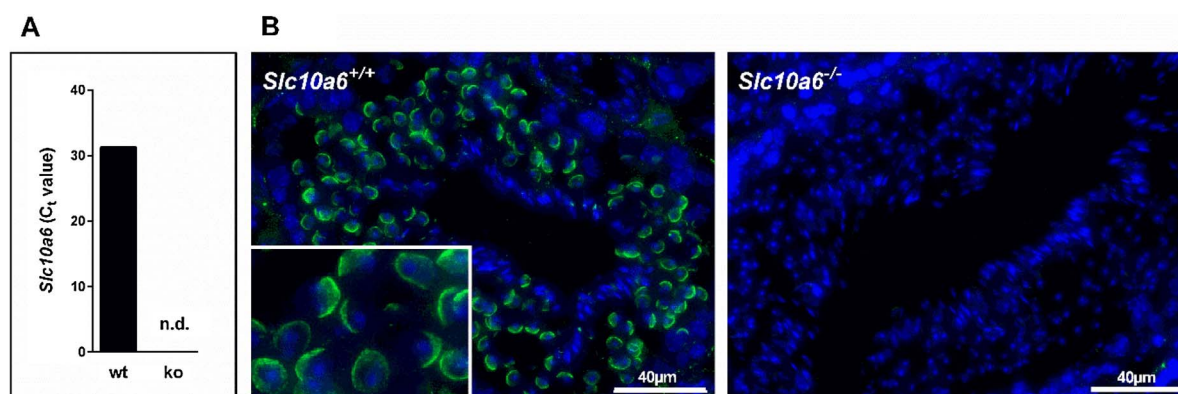


Fig. 2. Confirmation of the *Slc10a6* knockout at the RNA and protein levels.

(A) *Slc10a6* mRNA expression in the testis of *Slc10a6* wt and homozygous ko mice was analyzed by quantitative real-time PCR using a gene-specific *TaqMan* probe as shown in Fig. 1A. *Slc10a6* expression is represented by the C_T value. *Hprt* served as endogenous control with C_T values of 25.39 ± 0.06 and 24.73 ± 0.05 for the wt and ko testis samples, respectively. Values represent means \pm SD of triplicate determinations. (B) Immunofluorescence studies were performed on paraformaldehyde-fixed testis cryosections from *Slc10a6*^{-/-} ko and *Slc10a6*^{+/+} wt mice. The *Soat* protein was detected by the mSoat₃₂₉₋₃₄₄ antibody (1:500 dilution) with subsequent immunofluorescent staining using the Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit antibody (1:800, green fluorescence). Nuclei were stained with DAPI (blue fluorescence). *Soat* was detected in round spermatids of the *Slc10a6* wt mice, but not in the *Slc10a6* ko animals. N.d., not detectable.

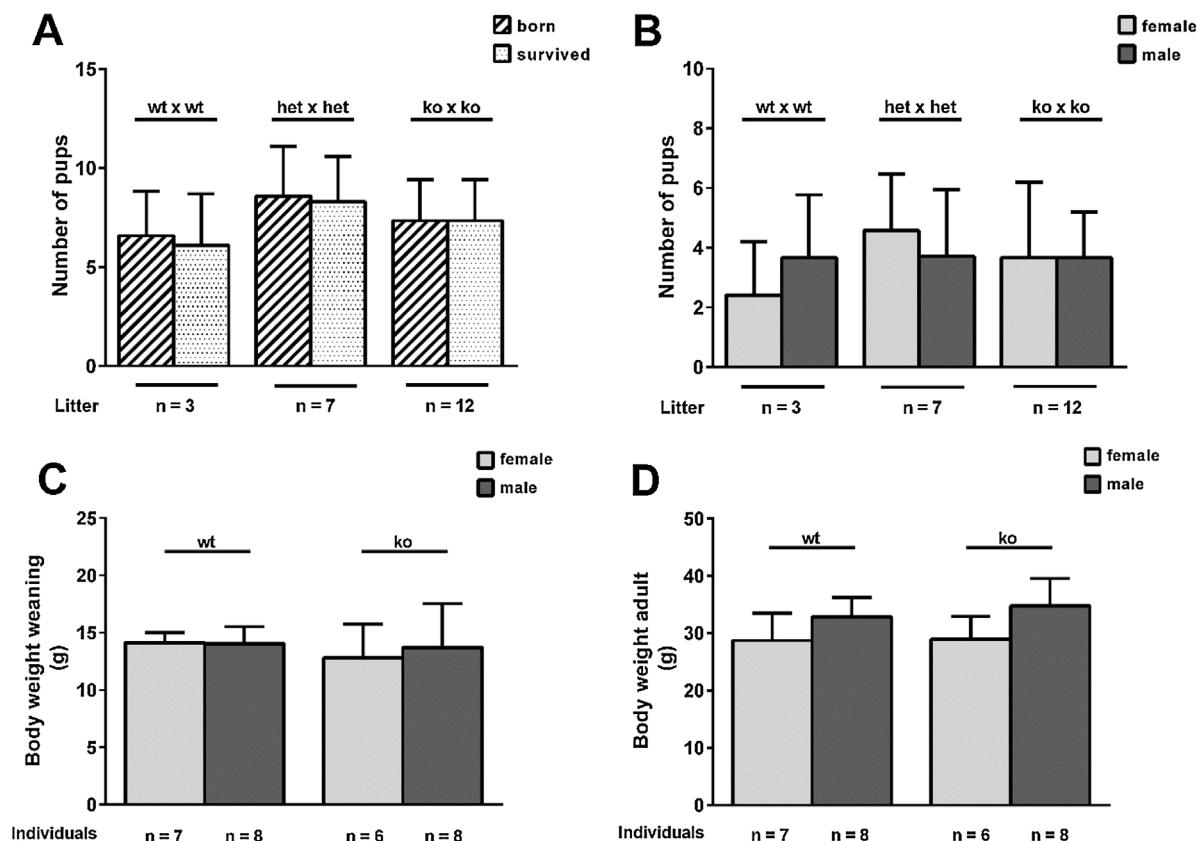


Fig. 3. Reproductive data of the *Slc10a6* wt and ko mice.

Viability and fertility of the progeny were analyzed by specific matings of *Slc10a6* wt × wt, het × het, or ko × ko mice. (A) Number of pups and their survival until weaning were recorded and (B) distribution between the sexes was analyzed. Body weight was determined for all mice at weaning (C) and at 22 to 31 weeks of age when mice were sacrificed for further investigations (D). Group sizes are indicated for each column and data are depicted as means ± SD. All data were statistically analyzed by one-way ANOVA, but revealed no significant differences.

as SCO syndrome ($0.59\% \pm 1.22\%$ ko vs. $0.12\% \pm 0.21\%$ wt) were both more frequent in the *Slc10a6*^{-/-} mice, but without reaching the level of significance due to large variability in the data (Fig. 4D).

Despite comparable histomorphological appearance, sperm morphology and motility were examined more closely between *Slc10a6* wt and ko mice. For this purpose, CASA was applied on sperm samples. Total and progressive motility (Fig. 5A, B) were analyzed using the sperm motility parameters VCL (curvilinear velocity), VAP (average path velocity), and VSL (straight-line velocity), but no differences were detectable between *Slc10a6* ko and wt mice. Furthermore, sperm morphology was assessed, including the following parameters: abnormal heads (AH), abnormal acrosomes (AA), normal heads (NH), detached heads (DH), abnormal midpieces (AM), bent midpieces (BM), bent tails (BT), coiled tails (CT), premature germ cells (PGC), proximal cytoplasmic droplets (PD) and distal cytoplasmic droplets (DD) (Fig. 5C). However, none of these parameters showed any significant difference between the *Slc10a6* wt and ko mice.

Apart from the testis, Soat-mediated transport of sulfated steroids may participate in the overall regulation of serum steroids in the sulfo-conjugated as well as in the un-conjugated form. Thus, a comprehensive targeted steroid analysis comprising 12 sulfo-conjugated and 9 un-conjugated steroids was performed in the serum of male and female *Slc10a6* wt and ko mice (n = 8 in each group). Among them, 17-OH-pregnenolone sulfate (17-OH-PregS), estrone sulfate (E₁S), estradiol sulfate (E₂S), epiandrosterone sulfate (epiAnS), and testosterone sulfate (TS) all were not found in any of the samples. Pregnenolone sulfate (PregS), dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), androsterone sulfate (AnS), and dihydrotestosterone sulfate (DHTS) were detected in some, but not all of the samples. Androstenediol sulfate (AnDiolS) and epitestosterone sulfate (eTS) were detected in all samples, but below the

limit of quantification. Therefore, none of these data could be quantitatively analyzed. Only serum cholesterol sulfate (CS) could be detected at quite high concentrations of 942–2559 ng/ml in the serum of all mice. Interestingly, CS was significantly elevated in the serum of the male *Slc10a6*^{-/-} ko mice (3738 ± 569 ng/ml) compared to the male *Slc10a6*^{+/+} wt mice (2683 ± 490 ng/ml), whereas the CS levels were comparable between the female *Slc10a6* ko and wt mice (Fig. 6A).

Regarding the un-conjugated steroids testosterone (T), 4-androstenedione (4A), androstenediol (AD), dehydroepiandrosterone (DHEA), dihydrotestosterone (DHT), 17-OH-progesterone (17-OH-Prog), progesterone (Prog), 11-deoxycortisol, and corticosterone could be detected in the sera from all mice, however, below the limit of quantification for most if not all samples precluding statistical analysis. Only the levels of T in the male mice as well as of corticosterone (males and females) were above the limit of quantification for all samples and, therefore, allowed statistical analysis. However, serum levels of testosterone and corticosterone were not significantly different between the *Slc10a6* ko and wt mice (Fig. 6).

4. Discussion

The present study represents the first characterization of the *Slc10a6* ko mouse and has a focus on the consequences of complete absence of the Soat protein for reproduction and spermatogenesis in mice. Previous studies demonstrated, that SOAT/Soat is highly expressed in male germ cells [5,9] and acts as specific steroid sulfate uptake carrier for hormonal precursors such as E₁S, E₂S, PregS, DHEAS, 16 α -OH-DHEAS, and AnDiolS [3,5,6,9]. These inactive steroid compounds can be reactivated by STS and so may have an intracrine effect on male reproduction [11]. It is well known that spermatogenesis and male

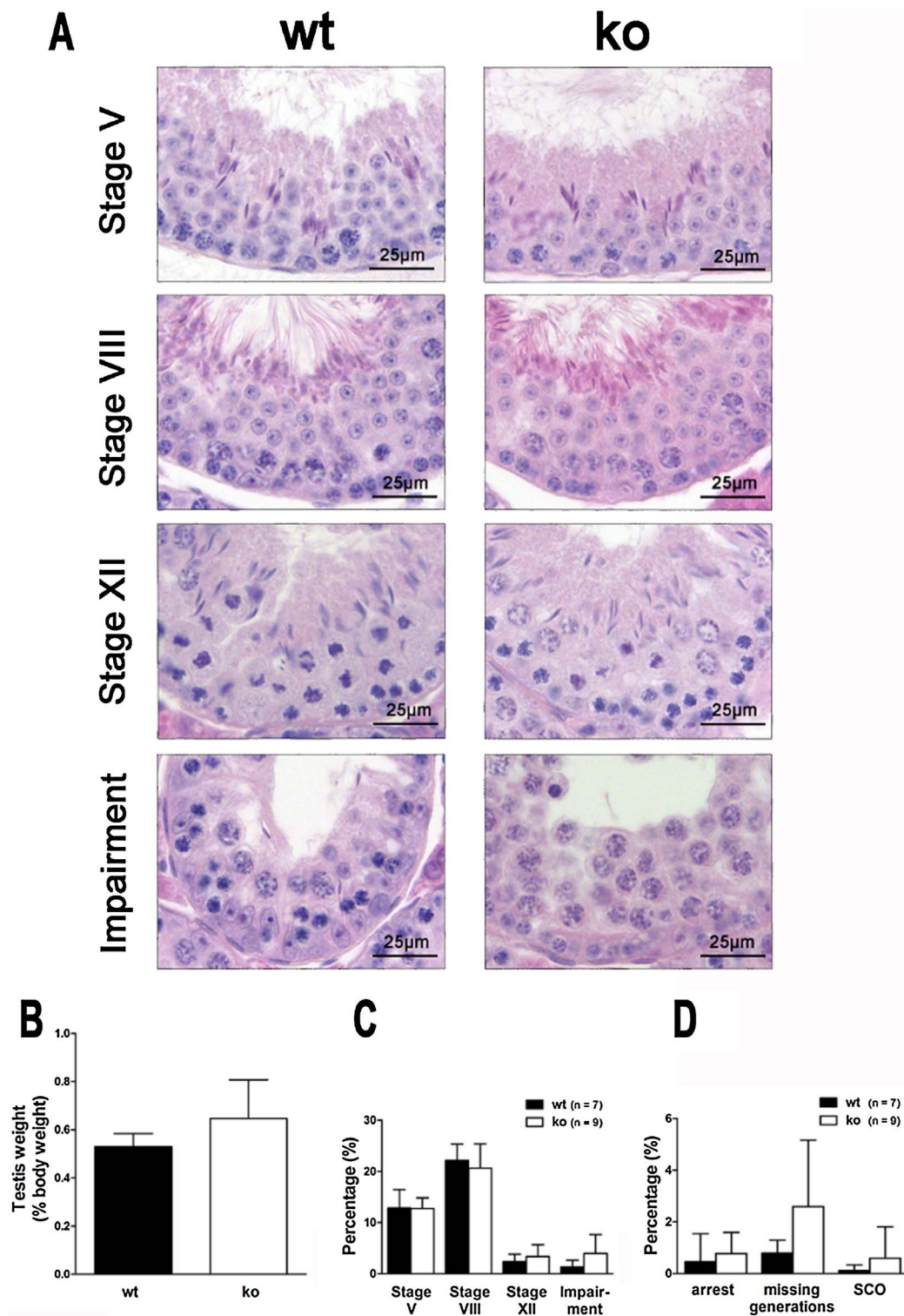


Fig. 4. Histomorphometric analysis of spermatogenesis in *Slc10a6* wt and ko mice.

For histological evaluation of spermatogenesis, testes from 12-week old *Slc10a6* wt and ko mice (n = 3 each) were fixed in Bouin's solution and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin. Staging of the spermatogenesis was performed according to [15]. (A) Three different stages were counted to give an overview of spermatogenesis in *Slc10a6* wt and ko animals: Stage V (appearance of type B spermatogonia), stage VIII (sperm release and onset of meiosis) and stage XII (first meiotic division). Moreover, tubules with impaired spermatogenesis were assessed. Here, an arrest of spermatogenesis at the level of primary spermatocytes is shown for both genotypes. (B) Prior to fixation, testis weights were determined and related to body weight. (C) Percentages of different stages (V, VIII and XII) showed no significant differences between *Slc10a6* wt and ko animals and were in line with the physiological frequency of spermatogenic stages described by [15]. Additionally, frequency of tubules showing impairments of spermatogenesis (namely germ cell aplasia = SCO, arrest of spermatogenesis at the level of primary spermatocytes, and missing generations of germ cells) showed no significant differences between genotypes. (D) Itemization of impairments of spermatogenesis in both genotypes are depicted for arrest of spermatogenesis, missing generations and SCO. Data are presented as percentage of stages and defective tubules in the whole testis slides, and represent means ± SD. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA but revealed no significant differences between *Slc10a6* wt and ko mice.

fertility highly depend on steroid hormone regulation and there is evidence that sulfated steroids participate in this process [8,19,20]. Considering our current knowledge about SOAT/Soat, we assume that this carrier fulfills a functional role in the local supply of germ cells with sulfated steroids, which then may be involved in the regulation of spermatogenesis. Although the *Slc10a6*^{-/-} ko mice proved to be fertile in mating experiments, we closer analyzed sperm motility and morphology of *Slc10a6* ko mice compared to wt mice of the same age and same state of development. We used computer-assisted sperm analysis (CASA) by which sperm motility can be analyzed in a standardized way

[21]. Although CASA cannot predict fertility, it can provide important information concerning the quality of sperm [22]. Because different CASA systems use different algorithms and no reference values are present for mouse sperm, the obtained values are difficult to compare with other studies [23]. However, this is less relevant, because the present study only focused on the comparison between the *Slc10a6* ko and wt mice. The semen analysis showed no significant differences in sperm number, morphology or motility parameters. Merely a tendency toward poorer sperm quality of *Slc10a6*^{-/-} ko mice was recognized. Therefore, we had a closer look on the spermatogenesis of the

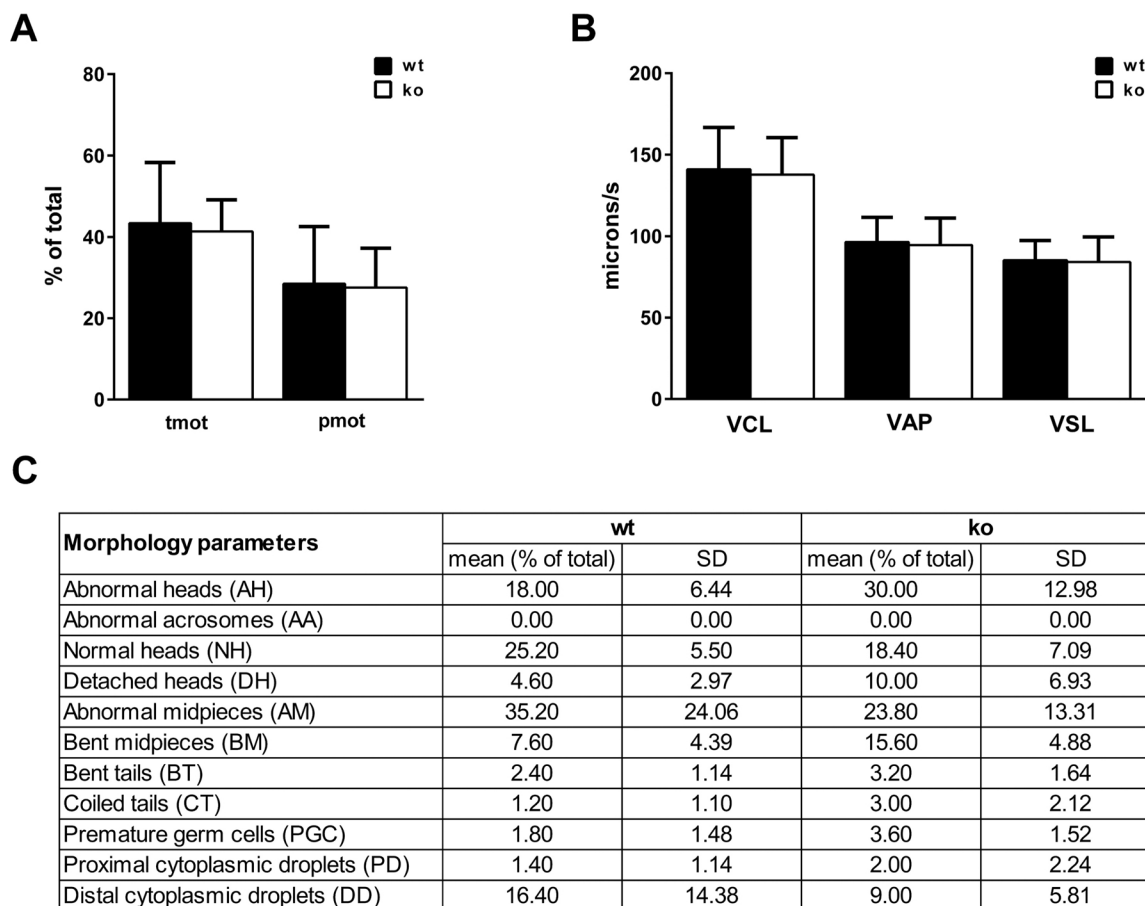


Fig. 5. CASA and sperm morphology.

(A) Motility of caudal sperm suspensions was assessed by CASA and revealed no differences in the total motility (tmot) and progressive motility (pmot) between the *Slc10a6* ko and wt mice. (B) The sperm motility parameters VCL (curvilinear velocity), VAP (average path velocity), and VSL (straight-line velocity) were specified and showed no significant differences. (C) Sperm morphology was analyzed for abnormal heads (AH), normal heads (NH), abnormal acrosomes (AA), detached heads (DH), abnormal midpieces (AM), bent midpieces (BM), bent tails (BT), coiled tails (CT) and premature germ cells (PGC). Furthermore, proximal cytoplasmic droplets (PD) and distal cytoplasmic droplets (DD) were determined. Data represent means \pm SD (n = 5 for each genotype) and were statistically analyzed by one-way ANOVA.

Slc10a6^{-/-} ko mice and performed histomorphological evaluation of the testes of *Slc10a6* ko and wt mice, including staging of spermatogenesis. In normal unaffected testicular tissue, the occurrence of specific stages of spermatogenesis gives evidence for the length of the seminiferous epithelium cycle (for review see [15]). Based on our data, in respect of the occurrence of the stages V, VIII, and XII, there were no differences between the *Slc10a6* wt and ko mice. However, frequency of seminiferous tubules with impaired spermatogenesis, in particular those with missing generations seemed to be increased, but without reaching the level of significance. Therefore, *Slc10a6* gene knockout seems not to significantly impair spermatogenesis per se. However, it has to be noted that impairment of spermatogenesis is a multifactorial problem [24] and only in few cases depends on single gene mutation [25]. For example, knockout of the *gap junction protein alpha 1 (Gja1)* gene coding for connexin43 (CX43) results in direct breakdown of spermatogenesis with an arrest at the level of spermatogonia and/or SCO [26,27]. CX43 plays a pivotal role in Sertoli cells for regulation of the blood-testis barrier dynamics and so has a more fundamental role for spermatogenesis (see [28] for review). In contrast, Soat could have a more regulatory function in the testis and so *Slc10a6* knockout might be more easily compensated, e.g. by upregulation of another steroid sulfate carrier from the OATP carrier family [7]. Such a compensatory upregulation is known from other transporter knockout mice. As an example, upregulation of the organic cation transporter OCT3 (which has transport activity for serotonin) was described in certain brain regions of *Slc6a4*^{-/-} knockout mice, deficient for the specific serotonin

transporter SERT [29,30]. On this background, further studies are needed to compare the gene expression pattern of the *Slc10a6* ko mice with their wt controls.

In order to investigate the role of Soat for steroid sulfate transport in the mouse in a more general way, steroid profiling was performed on serum samples from male and female *Slc10a6* ko and wt mice. LC-MS/MS was applied to analyze 12 sulfo-conjugated steroids and GC-MS/MS was used for determination of 9 un-conjugated steroids, as reported previously from our group [17,18]. However, only CS, T and corticosterone could be detected in quantifiable amounts in all serum samples, whereas the other steroids were below the limit of quantification or even undetectable in the mouse serum. Corticosterone was the most abundant un-conjugated steroid with values ranging from 7 to 200 ng/ml. Testosterone was the dominant androgen, found in the male mice with values of 0.2–8.9 ng/ml. The levels of both steroids were within the range of previous studies [31–34], but showed no significant differences between the *Slc10a6* ko and wt mice. In contrast, CS was significantly increased in the serum of the male *Slc10a6*^{-/-} mice compared to the *Slc10a6*^{+/+} mice, but showed comparable values in the female mice. CS is an important component of spermatozoa [35] and is considered to act as plasma membrane stabilizer and potent inhibitor of the sperm acrosomal proteinase acrosin [36]. It was hypothesized that cleavage of the sperm-associated CS occurs within the female reproductive tract. Here, it might be important for sperm capacitation and fertilization [37]. As SOAT/Soat was localized in the Golgi compartment of spermatozoa [5,9] as well as in the plasma membrane of

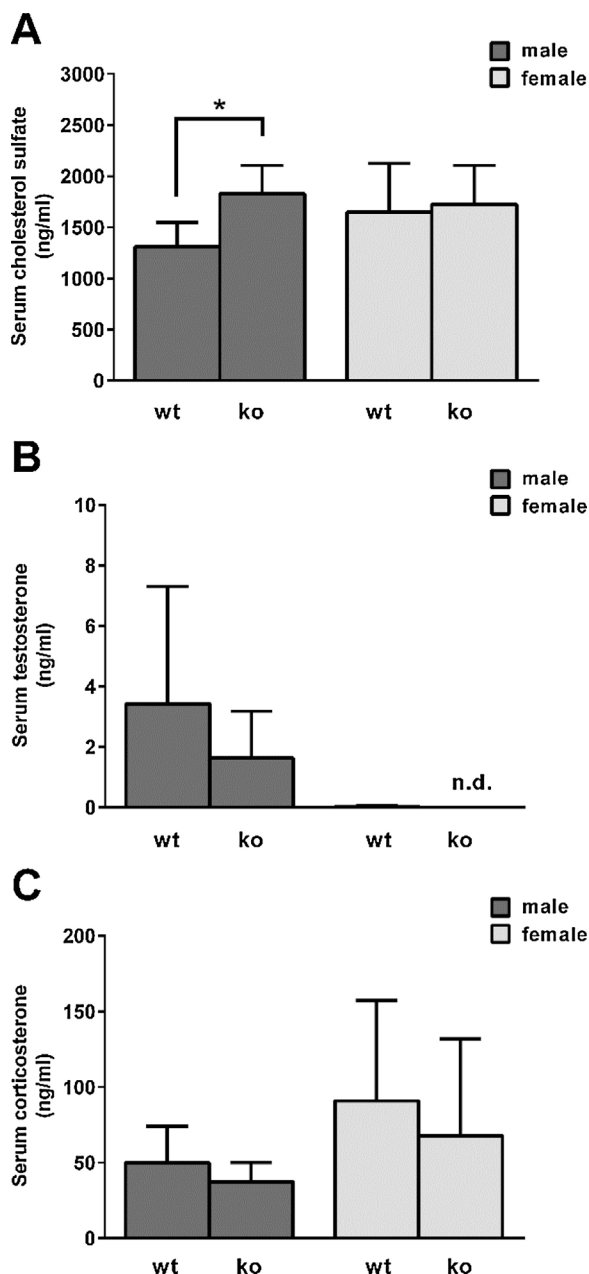


Fig. 6. Levels of cholesterol sulfate, testosterone, and corticosterone in the serum of *Slc10a6* ko and wt mice.

(A) From the group of steroid sulfates only CS could be quantified for all samples and was present in the mouse serum at quite high concentrations of 942–2559 ng/ml. In the case of unconjugated steroids, only T (B) and corticosterone (C) levels could be quantified in the mouse serum for all samples, but did not show any significant differences between the *Slc10a6* ko and wt mice. Age of the mice with $n = 8$ per group: male wt 21–31 weeks, male ko 17–30 weeks, female wt 26–31 weeks, female ko 11–30 weeks. *Significantly different from wt mice with $p < 0.05$ following one-way ANOVA.

round spermatids (Fig. 2), this carrier might be involved in the uptake and accumulation of CS in Golgi vesicles, which later form the acrosomal cap. However, to support this hypothesis it has to be demonstrated that SOAT/Soat indeed can transport CS in a similar manner as other sulfated steroids, what could not be achieved in the present study. Apart from the testis, CS is of significant importance in the skin, which acquires sulfated steroids via the sulfatase pathway after carrier-mediated import [38,39]. Soat was previously localized in the epidermis by immunohistochemistry and might be involved in this process [9]. Interestingly, patients with steroid sulfatase deficiency causing recessive X-linked ichthyosis (RXLI) show scales on their skin, caused by high

concentrations of non-cleaved CS, and elevated levels of plasma CS [40,41]. It can be supposed that abolished Soat transport of CS in the skin may cause elevated plasma CS levels in a similar manner. Therefore, it will be interesting to further analyze the skin of the *Slc10a6* ko mice, what was out of the scope of the present study.

In conclusion: SOAT/Soat is a specific steroid sulfate carrier with high expression in endocrine active tissues and was supposed to be important for male fertility. To clarify this role in vivo we established an *Slc10a6* ko mouse model and analyzed its reproductive ability, spermatogenesis and steroid profile. Although the *Slc10a6*^{-/-} mice showed normal reproduction and spermatogenesis when compared with *Slc10a6*^{+/+} wt controls, the male *Slc10a6* ko mice revealed elevated serum levels of CS. This could be a relevant finding for the role of SOAT/Soat even in non-reproductive organs, e.g. the skin and lung, and needs further investigation.

Acknowledgements

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Research Group FOR1369 “Sulfated Steroids in Reproduction” with grants to JG (GE1921/4-1/2) and DF (FI1927/1-2). The authors thank Matthias Holtemeyer, Bärbel Fühler, Regina Leidolf, Alexandra Hax, Amy Gonzales, and Benjamin Morpurgo for their technical help and assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.07.019>.

References

- [1] J. Geyer, T. Wilke, E. Petzinger, The solute carrier family SLC10: more than a family of bile acid transporters regarding function and phylogenetic relationships, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372 (2006) 413–431.
- [2] J. Geyer, J.R. Godoy, E. Petzinger, Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 300–306.
- [3] J. Geyer, B. Döring, K. Meerkamp, B. Ugele, N. Bakhiya, C.F. Fernandes, J.R. Godoy, H.R. Glatt, E. Petzinger, Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6), *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19728–19741.
- [4] C.E. Galuska, M.F. Hartmann, A. Sánchez-Guijo, K. Bakhaus, J. Geyer, G. Schuler, K.P. Zimmer, S.A. Wudy, Profiling intact steroid sulfates and unconjugated steroids in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), *Analyst* 138 (2013) 3792–3801.
- [5] D. Fietz, K. Bakhaus, B. Wapelhorst, G. Grosser, S. Günther, J. Alber, B. Döring, S. Kliesch, W. Weidner, C.E. Galuska, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, M. Bergmann, J. Geyer, Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis – Cellular localization, expression pattern and functional analysis, *PLoS One* 8 (5) (2013) e62638.
- [6] H. Schweigmann, A. Sánchez-Guijo, B. Ugele, K. Hartmann, M.F. Hartmann, M. Bergmann, C. Pfarrer, B. Döring, S.A. Wudy, E. Petzinger, J. Geyer, G. Grosser, Transport of the placental estriol precursor 16 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 α -OH-DHEAS) by stably transfected OAT4-, SOAT-, and NTCP-HEK293 cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143 (2014) 259–265.
- [7] M. Roth, A. Obaidat, B. Hagenbuch, OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLC0 and SLC22A gene superfamilies, *Br. J. Pharmacol.* 165 (2012) 1260–1287.
- [8] J. Geyer, K. Bakhaus, R. Bernhardt, C. Blaschka, Y. Dezhkam, D. Fietz, G. Grosser, K. Hartmann, M.F. Hartmann, J. Neunzig, D. Papadopoulos, A. Sánchez-Guijo, G. Scheiner-Bobis, G. Schuler, M. Shihan, C. Wrenzycki, S.A. Wudy, M. Bergmann, The role of sulfated steroid hormones in reproductive processes. Concept and review paper of the DFG research group FOR 1369 Sulfated Steroids in Reproduction, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 172 (2017) 207–221.
- [9] G. Grosser, D. Fietz, S. Günther, K. Bakhaus, H. Schweigmann, B. Ugele, R. Brehm, E. Petzinger, M. Bergmann, J. Geyer, Cloning and functional characterization of the mouse sodium-dependent organic anion transporter Soat (*Slc10a6*), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138 (2013) 90–99.
- [10] M.J. Reed, A. Purohit, L.W. Woo, S.P. Newman, B.V. Potter, Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition, *Endocr. Rev.* 26 (2005) 171–202.
- [11] F. Labrie, All sex steroids are made intracellularly in peripheral tissues by the mechanisms of intracrinology after menopause, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 145 (2015) 133–138.
- [12] J.W. Müller, L.C. Gilligan, J. Idkowiak, W. Arlt, P.A. Foster, The regulation of steroid action by sulfation and desulfation, *Endocr. Rev.* 36 (2015) 526–563.

- [13] G.T. Wong, Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains, *Neuropeptides* 36 (2002) 230–236.
- [14] P. Markel, P. Shu, C. Ebeling, G.A. Carlson, D.L. Nagle, J.S. Smutko, K.J. Moore, Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains, *Nat. Genet.* 17 (1997) 280–284.
- [15] L.D. Russell, R.A. Ettl, A.P. Sinha Hikim, E.D. Clegg, Staging for laboratory species, in: L.D. Russell (Ed.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, 1st ed., Cache River Press, Clearwater, 1990, pp. 119–161.
- [16] C.C. Love, R.M. Kenney, The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion, *Theriogenology* 50 (1998) 955–972.
- [17] A. Sánchez-Guijo, V. Oji, M.F. Hartmann, H. Traupe, S.A. Wudy, Simultaneous quantification of cholesterol sulfate, androgen sulfates, and progestagen sulfates in human serum by LC-MS/MS, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 1843–1851.
- [18] A. Sánchez-Guijo, M.F. Hartmann, S.A. Wudy, Introduction to gas chromatography-mass spectrometry, *Methods Mol. Biol.* 1065 (2013) 27–44.
- [19] A. Ruokonen, T. Laatikainen, E.A. Laitinen, R. Vihko, Free and sulfate-conjugated neutral steroids in human testis tissue, *Biochemistry* 11 (1972) 1411–1416.
- [20] A.H. Payne, R.B. Jaffe, Androgen formation from pregnenolone sulfate by fetal, neonatal, prepubertal and adult human testes, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40 (1975) 102–107.
- [21] J.M. Gallardo Bolaños, A. Miró Morán, C.M. Balao da Silva, A. Morillo Rodríguez, M. Plaza Dávila, I.M. Aparicio, J.A. Tapia, C. Ortega Ferrusola, F.J. Peña, Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration, *PLoS One* 7 (2012) e30688.
- [22] R.P. Amann, D. Waberski, Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments, *Theriogenology* 17 (2014) 5-17.e1-3.
- [23] J.C. Lu, Y.F. Huang, N.Q. Lü, Computer-aided sperm analysis: past, present and future, *Andrologia* 46 (2014) 329–338.
- [24] H.J. Cooke, P.T. Saunders, Mouse models of male infertility, *Nat. Rev. Genet.* 3 (2002) 790–801.
- [25] A. Ferlin, F. Raicu, V. Gatta, D. Zuccharell, G. Palka, C. Foresta, Male infertility: role of genetic background, *Reprod. Biomed. Online* 14 (2007) 734–745.
- [26] R. Brehm, M. Zeiler, C. Rüttinger, K. Herde, M. Kibschull, E. Winterhager, K. Willecke, F. Guillou, C. Lécureuil, K. Steger, L. Konrad, K. Biermann, K. Failing, M. Bergmann, A sertoli-cell specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis, *Am. J. Pathol.* 17 (2007) 19–31.
- [27] S. Sridharan, R. Brehm, M. Bergmann, P.S. Cooke, Role of Connexin 43 in Sertoli cell of the testis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1120 (2007) 131–143.
- [28] J. Gerber, J. Heinrich, R. Brehm, Blood-testis barrier and Sertoli cell function: lessons from SCCx43KO mice, *Reproduction* 151 (2016) R15–27.
- [29] J.J. Chen, Z. Li, H. Pan, D.L. Murphy, H. Tamir, H. Koepsell, M.D. Gershon, Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters, *J. Neurosci.* 21 (2001) 6348–6361.
- [30] A. Schmitt, R. Mössner, A. Gossmann, I.G. Fischer, V. Gorboulev, D.L. Murphy, H. Koepsell, K.P. Lesch, Organic cation transporter capable of transporting serotonin is up-regulated in serotonin transporter-deficient mice, *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 701–709.
- [31] K.M. McNamara, D.T. Harwood, U. Simanainen, K.A. Walters, M. Jimenez, D.J. Handelsman, Measurement of sex steroids in murine blood and reproductive tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 121 (2010) 611–618.
- [32] Y. Weng, F. Xie, L. Xu, D. Zagorevski, D.C. Spink, X. Ding, Analysis of testosterone and dihydrotestosterone in mouse tissues by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 402 (2010) 121–128.
- [33] H. Li, X. Liu, Y. Poh, L. Wu, Q.G. Zhou, B.C. Cai, Rapid determination of corticosterone in mouse plasma by ultra fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2013) 1860–1863.
- [34] M.E. Nilsson, L. Vandenput, Å. Tivesten, A.K. Norlén, M.K. Lagerquist, S.H. Windahl, A.E. Börjesson, H.H. Farman, M. Poutanen, A. Benrick, M. Maliqueo, E. Stener-Victorin, H. Ryberg, C. Ohlsson, Measurement of a comprehensive sex steroid profile in rodent serum by high-sensitive gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Endocrinology* 156 (2015) 2492–2502.
- [35] G. Lalumière, G. Bleau, A. Chapdelaine, K.D. Roberts, Cholesteryl sulfate and sterol sulfate in the human reproductive tract, *Steroids* 27 (1976) 247–260.
- [36] P.J. Burck, R.E. Zimmermann, The inhibition of acrosome by sterol sulphates, *J. Reprod. Fertil.* 58 (1980) 121–125.
- [37] J. Langlais, M. Zollinger, L. Plante, A. Chapdelaine, G. Bleau, K.D. Roberts, Localization of cholesteryl sulfate in human spermatozoa in support of a hypothesis for the mechanism of capacitation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 7266–7270.
- [38] F. Labrie, V. Luu-The, C. Labrie, G. Pelletier, M. El-Alfy, Intracrinology and the skin, *Horm. Res.* 54 (2000) 218–229.
- [39] C.C. Zouboulis, Human skin: an independent peripheral endocrine organ, *Horm. Res.* 54 (2000) 230–242.
- [40] C.H. Shackleton, S. Reid, Diagnosis of recessive X-linked ichthyosis: quantitative HPLC/mass spectrometric analysis of plasma for cholesterol sulfate, *Clin. Chem* 35 (1989) 1906–1910.
- [41] A. Sánchez-Guijo, V. Oji, M.F. Hartmann, H.C. Schuppe, H. Traupe, S.A. Wudy, High levels of oxysterol sulfates in serum of patients with steroid sulfatase deficiency, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 403–412.

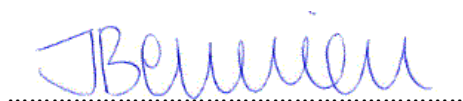
ERKLÄRUNG

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation

**DER SODIUM-DEPENDENT
ORGANIC ANION TRANSPORTER SOAT
SUBSTRATSPEKTRUM, GENETISCHE VARIANTEN IM MENSCHEN UND
EFFEKTE IN DER SOAT KNOCKOUT MAUS**

selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, sowie alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.



.....
Josefine Bennien

ISBN: 978-3-86345-450-0



Verlag der DVG Service GmbH
Friedrichstraße 17 • 35392 Gießen
Tel.: 0641 / 24466 • Fax: 0641 / 25375
E-Mail: info@dvg.de • Web: www.dvg.de