

Aus der
Urologischen Klinik und Poliklinik des
Klinikums der Ludwig-Maximilians Universität
Campus Großhadern, München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Christian Stief



vorgelegt von Dr. med. Dr. med. univ. Bernhard Haid

(2020)

Für
Stephanie,
Oskar und Luise

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
Forschungsleitende Fragen und Hypothesen	6
Wissenschaftliche Arbeiten	7
Die Expression von FGF8/10 und FGF Rezeptor 2 in der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien	7
Langerhans Zellen in der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien	12
Der Androgen Rezeptor im Epithel und in subepithelialen glatten Muskelzellen der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien und Buried penis	15
Zusammenfassung	18
Ausblick und Perspektive	19
Originalarbeiten im Rahmen des Habilitationsprojektes	21
Kongressbeiträge und Grundlagenpublikationen im Zusammenhang mit dem Habilitationsprojekt	21
Abkürzungsverzeichnis	23
Literaturverzeichnis	24
Dank	32
Quellenverweise auf die Originalarbeiten im Rahmen des Habilitationsprojektes	33

Einleitung

Hypospadien zählen mit einer Prävalenz von 0.3-0.8% zu den häufigsten kongenitalen Fehlbildungen bei Knaben und betreffen etwa 200 von 100.000 Neugeborenen (Bergmann, 2015). Der größte Anteil davon tritt nicht im Rahmen von Fehlbildungssyndromen auf: Die zugrundeliegenden genetischen Ursachen sind heterogen und die vielen bereits identifizierten möglicherweise ursächlichen genetischen Mutationen von stark variabler Penetranz (Marrocco, 2015). Vor einem genetischen Hintergrund spielen in der Ätiologie von Hypospadien auch Umweltfaktoren, insbesondere sogenannte endokrine Disruptoren, eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung dieser Fehlbildung; höchstwahrscheinlich im Sinne eines epigenetischen Einflusses (Kalfa, 2011; Marrocco, 2015; Carmichael, 2012).

In einer frühen Phase der Embryonalentwicklung des Penis, ab der 7. Gestationswoche (GW), sind in erster Linie vom endokrinologischen System unabhängige Mechanismen wesentlich: hier spielen die Gene WT1, SF1, die Homeobox Gene, insbesondere HOXA13, SHH sowie die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF) 8, 10 und deren Rezeptor FGFR2 eine Rolle. In der späteren Embryonalentwicklung bis zur 21. GW konnte ein Einfluss von Androgen- (AR) und Östrogenrezeptor (ER) Mutationen bestätigt werden (Li, 2006; Beleza Meireles, 2007; Pechriggl, 2013).

Während primär das Gewebe an der Ventralseite des Penis betroffen zu sein scheint, ist – makroskopisch – auch das Präputium bei Hypospadiepatienten im Sinne einer schlaffen, gefältelten dorsalen „Vorhautschürze“ verändert.

In mehreren tierexperimentellen Arbeiten wurde gezeigt, dass die in der frühen Phase der Embryologie des Penis maßgeblichen Mutationen auch die vom Ektoderm abstammenden Gewebe – und damit die gesamte Haut des Penis – beeinflussen (Harada, 2015; Gredler, 2015). Überdies zeigte sich in diesen Studien eine direkte Abhängigkeit der Entwicklung der Urethra von einem intakten ektodermalen Oberflächenepithel, was auch experimentell mittels gewebespezifischen knock-out Modellen nachgewiesen wurde (Gredler, 2015).

Die Komplikations- und Reoperationsrate in der Hypospadi chirurgie, ist – stark abhängig vom Schweregrad der Ausprägung der Hypospadi – nach wie vor hoch: in bis zu 21-52% der Fälle sind ungeplante Sekundäreingriffe notwendig (Spinoit, 2013; Spinoit, 2015). Dies basiert einerseits auf den komplexen mikrochirurgischen Techniken zur Rekonstruktion der

Urethra in Kombination mit schwierigen anatomischen Ausgangsbedingungen und damit verbundenen Problemen der Perfusion und Wundheilung. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass die Wundheilung auf Basis der zugrundeliegenden Fehlbildung gestört sein könnte wie sich beispielsweise in einem kürzlich publizierten Rattenmodell mit Flutamid induzierten Hypospadien zeigte (Zhou, 2018).

Damit erscheint es von größtem Interesse sowie klinischer Relevanz die ursächlichen Faktoren der Hypospadien in Hinblick auf die penile Haut zu untersuchen.

Mit den drei in diesem Habilitationsprojekt zusammengefassten Laborforschungsprojekten werden neue Erkenntnisse im Bereich der Grundlagenforschung zur Hypospadien erschlossen. Das bessere Verständnis der Auswirkungen von Genetik und Embryologie auf die Anatomie und Funktion der Haut, insbesondere in Hinblick auf Wundheilung, Immunologie und Endokrinologie, stellt eine wesentliche Grundlage zur Weiterentwicklung klinischer Forschung (z.B. Ersatz von fehlenden Gewebemediatoren, perioperative Behandlung mit Hormonpräparaten) und zur verbesserten chirurgischen Therapie dieser Kinder dar.

Forschungsleitende Fragen und Hypothesen

FGF spielen in der frühen Phase der penilen Embryologie eine entscheidende Rolle. Für das Wachstum des Genitaltuberkels ist – wie in Tiermodellen demonstriert wurde – eine mesenchymale Aktivierung dieses Signalweges grundlegend; in einer späteren Phase der Embryogenese des Penis ist eine ektodermale FGF Aktivierung Voraussetzung für die Entwicklung der Urethra aber insbesondere auch für die des Präputiums und der penilen Haut (Gredler, 2015; Harada, 2015). In der Studie über die Expression von FGF im Präputium wurde die Hypothese überprüft, dass infolge der Rolle von FGF in der Embryopathogenese der Hypospadie eine qualitativ oder quantitativ veränderte FGF Expression vorliegen könnte. In der frühen Embryonalperiode, die für die Ausprägung von Hypospadien entscheidend ist, entwickelt sich auch das kutane Immunsystem (Schuster, 2014; Tripp, 2004). Vorläufer der Langerhans Zellen, der späteren epidermalen dendritischen Zellen, wandern in dieser Entwicklungsphase in die Epidermis ein. Im späteren Leben spielen diese Langerhans Zellen eine entscheidende Rolle für die kutane Immunologie, auch in Hinblick auf HIV und HPV (Steinman, 2007; Ganor, 2011; DaSilva, 2015). Aus diesem Grund wurde bei Knaben mit Hypospadie erstmalig die genaue Verteilung, Frequenz und Morphologie der Langerhans Zellen untersucht. Die Hypothese war, dass aufgrund der Ontogenese dieser Fehlbildung eine alterierte Einwanderung von Langerhans Zell-Vorläufern zu einer veränderten Frequenz und Morphologie der Langerhans Zellen führen würde.

Die Expression des AR (Androgenrezeptor) wird mit der Genese von Hypospadien in Zusammenhang gebracht. Die Tunica dartos der penilen Haut ist bei Buben mit Hypospadien different entwickelt, die Struktur der glatten Muskelfasern erscheint ungeordnet („chaotisch“) und im Vergleich zu Normalkontrollen, deutlich alteriert (Spinoit, 2015; Atmoko, 2018). Während es zur Expression des AR in der Epidermis einige Studien mit teils widersprüchlichen Ergebnissen gibt, wurde die AR Expression in den glatten Muskelzellen der Tunica dartos noch nicht untersucht (Qiao, 2012; Pichler, 2013). In dieser Studie prüften wir die Hypothese, dass die Expression des AR in glatten Muskelzellen der Tunica dartos und im Epithel der Vorhaut bei Patienten mit Hypospadien oder anderen Penisfehlbildungen quantitativ verändert wäre. Aufgrund der großen Zahl an verfügbaren Proben wurden auch das Alter bei der Korrekturoperation, weitere Fehlbildungen wie ein zusätzlich bestehender Kryptorchismus sowie das Geburtsgewicht als Einflussfaktoren miteinbezogen.

Wissenschaftliche Arbeiten

Die Expression von FGF8/10 und FGF Rezeptor 2 in der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien (Haid et al., J Ped Urol 2019)

Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren FGF8, FGF10 und deren Rezeptor, FGFR2 sind wesentlich für die embryonale Entwicklung des männlichen äußeren Genitale: FGFR2 scheint ein Bindeglied zwischen hormoneller und genetischer Steuerung der Phallusentwicklung zu sein (Gredler, 2015; Petiot, 2005). Unter der Kontrolle von mesenchymalem SHH (Sonic Hedgehog) sind sie sowohl an der Verschmelzung der Urethralfalten (FGF10 / FGFR2) als auch an der Bildung des Genitaltuberkels (FGF8) beteiligt (Haraguchi, 2000; Gredler, 2015). Dabei hängt ihre Expression mit der Expression des HOXd13-proteins zusammen, das im Rahmen der Entwicklung des Genitaltuberkels im Epithel der Urethra exprimiert wird. Aus Tiermodellen existieren Daten, die eine grundlegende Funktion von FGFR2 im Rahmen der Geschlechtsdifferenzierung untermauern: Gemeinsam mit seinem Liganden FGF9 ist FGFR2 – abhängig von AMH (Anti-Müller Hormon) – entscheidend für die Entwicklung von männlichen Keimdrüsen und in weiterer Folge Testes bzw. für die Unterdrückung der Entwicklung eines weiblichen inneren Genitale (Bagheri-Fam, 2017).

Nur durch die konzertierte Aktion auf beiden Ebenen – mesenchymal und epithelial ist eine „normale“ Penisentwicklung möglich. Aufgrund der wechselseitigen Expression verschiedener Proteine im Mesenchym und im Epithel der zukünftigen Urethra spricht man von einer mesenchymal-epithelialen Interaktion.

In einem Nebenprojekt dieser Studie konnten wir eine Serie von 25 humanen Feten, je 5 für die 8.-12. GW untersuchen (Nägele, 2017). In Schnitten durch den urogenitalen Sinus konnte die Expression von FGF2, FGF8, FGF10 und FGF2R im Epithel und im Stroma – dem mesenchymalen Gewebe des Genitaltuberkels – eindeutig gezeigt werden.

Dies könnte, auch in Hinblick auf die dazu bereits existente Literatur, die entscheidende Rolle von FGFR2 als mögliches Bindeglied zwischen hormonellen und genetischen Faktoren in der Embryogenese der Urethra weiter untermauern (Petiot, 2005; Gredler, 2015).



Expression von FGF in Epithel und Stroma des Urogenitalsinus humaner Feten in der 8.-12. Gestationswoche (Nägele, 2017)

Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass die vom FGF Signalweg abhängigen mesenchymalen Vorgänge sich auch auf die Differenzierung peniler Gewebe ektodermalen Ursprungs – in erster Linie der Haut, möglicherweise auch der glandulären Urethra – kritisch auswirken (Gredler, 2015; Harada, 2015):

FGFR2 wird während der Embryonalentwicklung sowohl im entodermalen Epithel der zukünftigen Urethra als auch im Oberflächenepithel des Genitaltuberkels exprimiert. In einem gewebespezifischen knock-out Modell für FGFR2 konnte gezeigt werden, dass ein Verlust entodermalen FGFR2s zur Ausprägung von milden Formen einer Hypospadien führt, während ein Verlust des ektodermalen FGFR2 schwerste Hypospadien zur Folge hat (Gredler, 2015). Dies beweist einerseits die Abhängigkeit der Entwicklung der (proximalen) Urethra von der Entwicklung des Oberflächenepithels – im Sinne einer epithelial-entodermal-mesenchymalen Interaktion. Andererseits liegt infolge dessen eine „Mitbeteiligung“ der penilen Haut im Rahmen von Hypospadien nahe.

Der FGF Signalweg – in einem weiteren murinen Modell dargestellt anhand der beiden wesentlichen FGF Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 – muss in einer definierten zeitlichen Abfolge sowohl im Mesenchym und im entodermalen Urethralepithel als auch im ektodermalen Epithel exprimiert werden, damit ein Wachstum des Genitaltuberkels und in weiterer Folge eine physiologische Entwicklung der Urethra möglich wird. Insbesondere eine

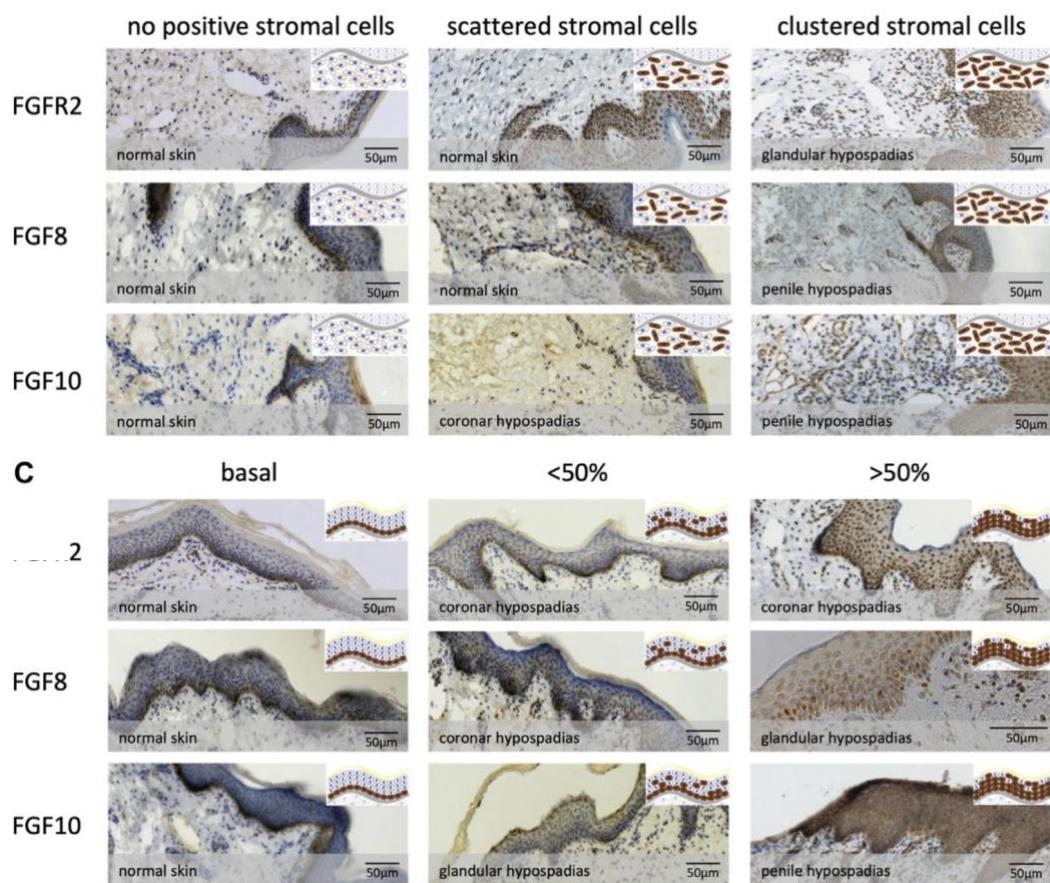
ektodermale Expression von FGF Molekülen und in Zusammenhang damit die Aktivierung des Wnt7a-Signalweges scheint für den ventralen Verschluss der Urethra essentiell zu sein (Harada, 2015).

Dementsprechend konnte auch in humanen Studien eine Assoziation zwischen Mutationen in FGF8, FGF10 und FGFR2 sowie in Genen abhängiger Signalwege (SHH, BMP7, BMP4, GLI) und dem Auftreten von Hypospadien gefunden werden: Betroffene Familien weisen ein drei bis vierfach erhöhtes Risiko für Hypospadien auf (Carmichael, 2013; Beleza-Meireles, 2007). In Tiermodellen mit Flutamid induzierten Hypospadien, und damit einem Induktionsmechanismus mit AR-mediierter Auswirkung auf die embryologische Rolle von FGF, zeigte sich eine retardierte Wundheilung (Zhou, 2018). Die Rolle des FGF Signalweges im Rahmen der Wundheilung wurde im Tiermodell klar nachgewiesen (Maddaluno, 2017; Meyer, 2012; Richardson, 2016; Oladipupo, 2014). Im Rahmen von Verbrennungen kommt FGF10 bereits in klinischen Studien erfolgreich zur Anwendung (Plichta, 2012).

Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderungen auf die Kutis wurden jedoch bisher noch nicht untersucht. Gerade aufgrund der hohen Inzidenz der Hypospadie und der noch vielen unbeantworteten Fragen – auch in Hinblick auf die Komplikationsrate und ein adäquates Klassifikationssystem, das sowohl mit der Embryopathogenese als auch mit der zu erwartenden Komplikationsrate korreliert – erscheinen diese Überlegungen wesentlich.

Für diese Studie wurden bei vorliegender, schriftlicher Einwilligung der Eltern während den Hypospadiieoperationen Hautproben vom ventralen Anteil der Vorhaut entnommen. Für die Untersuchung der FGF Expression erfolgte eine automatisierte immunhistochemische Färbung (Roche®Ventana) von kurz (24 bis maximal 48h) in 4%iger Paraformaldehydlösung fixierten 5µm Schnitten aus Vollhaut mittels FGF8, FGF10 und FGFR2 Antikörpern. In analoger immunhistochemischer Technik wurden die fetalen Präparate im Rahmen eines Nebenprojektes untersucht (Nägele, 2017). Die Auswertung erfolgte durch zwei bezüglich der Diagnose (distale oder proximale Hypospadie, Kontrolle) verblindete Untersucher anhand von zuvor festgelegten Patterns und Berechnung einer Interobservervarianz. Für die quantitative Analyse der Expression der mRNA wurde zunächst cDNA aus homogenisierten Vollhautproben präpariert. Mittels rtPCR wurde diese revers transkribiert, die Analyse erfolgte mittels eines SeniFAST SYBR® Systems.

In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass bei Knaben mit Hypospadien – ohne eine eindeutige Abhängigkeit von der Meatuslokalisation – FGF8, FGF10 und FGFR2 im Vergleich zu Patienten ohne Hypospadien ein deutlich alteriertes Expressionsmuster aufweisen: Während sich die FGF Expression in Kontrollen im Wesentlichen auf die basalen Epithelschichten konzentrierte, fanden wir bei Hypospadiepatienten eine diffuse, teils panepitheliale Expression aller drei untersuchten FGF. Auch in der Dermis bzw. im Stroma der Haut war die Expression bei Hypospadiepatienten signifikant unterschiedlich im Vergleich zu Kontrollen.



Expression von FGFR2, FGF8 und FGF10 im Stroma und im Epithel von Vorhautproben von Knaben ohne Penisfehlbildung und von Knaben mit Hypospadien. Während bei Knaben ohne Penisfehlbildung nur vereinzelt positive stromale Zellen und im Epithel eine vorwiegend basale Färbung nachweisbar ist, zeigen sich vor allem bei Knaben mit Hypospadien teils dichte stromale Zellinfiltrate und eine panepitheliale Färbung.

In einer zusätzlichen Analyse der mRNA derselben Patienten zeigte sich jedoch kein Unterschied bezüglich der Transkription der FGF8, 10 und FGFR2 Gene – wie es aufgrund des

immunhistochemischen Bildes hätte angenommen werden können.

Unsere Erkenntnisse unterstützen die Hypothese einer Mitbeteiligung von Geweben ektodermaler Herkunft – insbesondere des Präputiums – bei der Hypospadie. Wir konnten – erstmals in humanen Problem – einen qualitativen Unterschied der Expression eines in der Embryonalentwicklung wesentlichen Markers in der Haut zeigen. Dies könnte klinisch in Hinblick auf relevante Funktionen der FGF im Rahmen der postoperativen Wundheilung Relevanz besitzen – zur Klärung dieser sind weitere Studien notwendig. Der fehlende Nachweis eines Unterschieds in der Transkription der FGF Gene deutet auf eine Abhängigkeit der intraepithelialen FGF Expression von anderen Faktoren – möglicherweise von AR – hin.

Langerhans Zellen in der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien (Haid et al., BMJ Urol 2019)

Langerhans Zellen bilden ein dichtes Netzwerk in Epithelien der Körperoberfläche und aller Körperöffnungen. Sie erfüllen dabei die Funktion von immunologischen Wächtern, deren Aufgabe die Internalisierung von Antigenen und deren Transport zu lokoregionären Lymphknoten ist. Dort wird eine Immunantwort – je nach Antigen im Sinne einer Induktion von Immunität oder Toleranz – ausgelöst (Steinman, 2007). Das Kennzeichen der Langerhans Zellen im Vergleich zu anderen Subtypen dendritischer Zellen ist die Expression von Langerin (CD207), eines C-Typ-Lektin Rezeptors, welcher auch für die Bildung der typischen Birbeck Granula verantwortlich ist. Langerin bindet unter anderem HIV-1 und stellt – isoliert betrachtet – eine Barriere gegenüber einer HIV Infektion dar, wohingegen DC-SIGN, ein weiterer von Langerhans Zellen exprimierter Oberflächenrezeptor die HIV Infektion begünstigt (de Witte, 2007; van den Berg, 2012). Die Rolle der Langerhans Zellen bei der HIV Übertragung ist somit komplex – definitiv spielen sie eine wesentliche Rolle (Ganor, 2011). Auch bei der Infektion mit HPV sind Langerhans Zellen involviert: nur durch die gezielte Unterdrückung ihrer Funktion ist eine effektive HPV Infektion möglich (Fausch, 2002). Auch in Zusammenhang mit der HPV induzierten Karzinogenese spielen Langerhans Zellen eine Rolle: in Cervixkarzinom-Vorläuferläsionen können sie aktiviert werden und eine effektive Immunantwort auslösen (Da Silva, 2015).

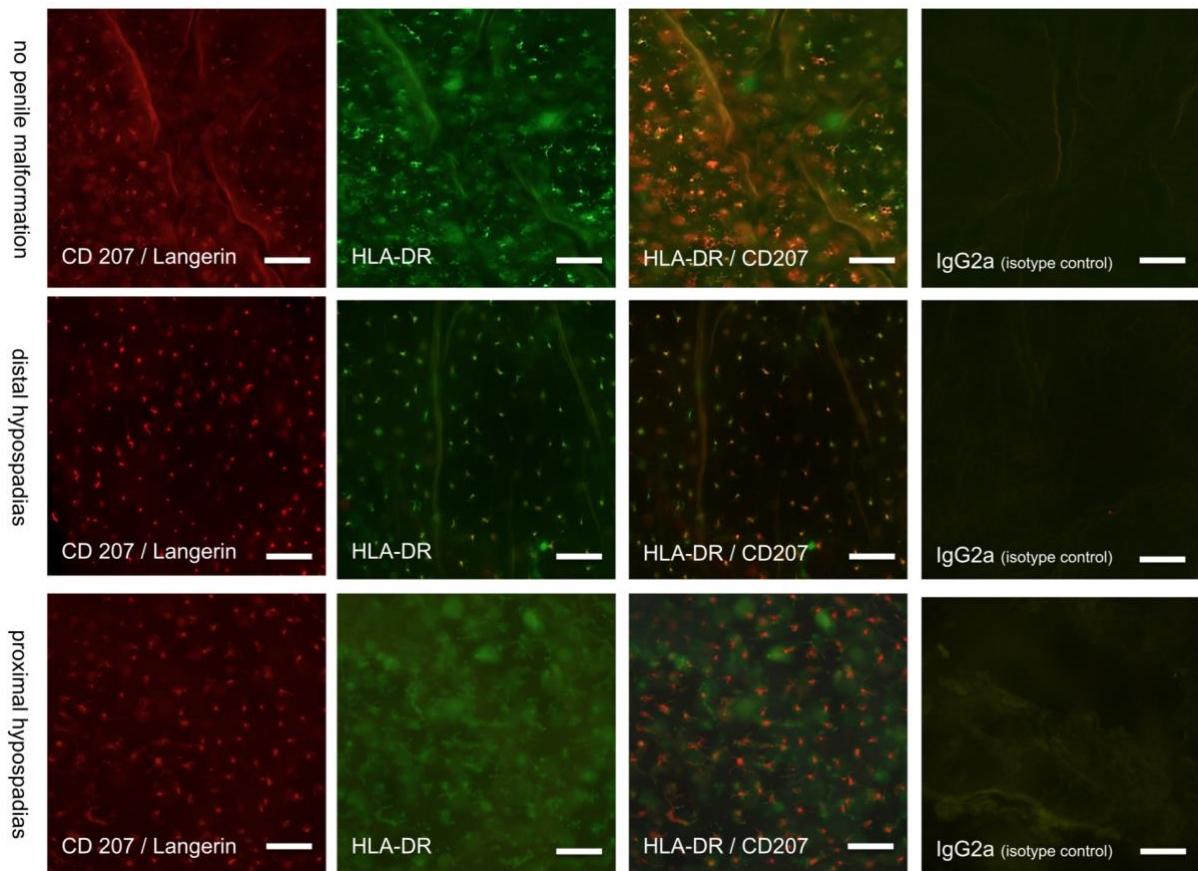
Wie in der vorangegangenen Arbeit gezeigt und aus tierexperimentellen Daten bekannt, ist auch die Vorhaut als Gewebe ektodermaler Abstammung in die Fehlbildung bei einer Hypospadien miteinbezogen (Haid, 2019; Gredler, 2015; Harada, 2015).

Die Besiedelung der Epidermis mit Langerhans Zell-Vorläufern in der 9.-14. GW, koinzidiert mit der Embryopathogenese von Hypospadien. Dies wurde auch in humanen Untersuchungen gezeigt (Schuster, 2009; Schuster, 2014). Die Expression von Langerin konnte – im Mausmodell – erst perinatal nachgewiesen werden (Tripp, 2004). Somit könnte in der Haut von Patienten mit Hypospadien die Mikroanatomie der Langerhans Zellen verändert sein, dazu gab es vor unserer Untersuchung keine Daten.

Auch für diese Studie wurden bei vorliegender, schriftlicher Einwilligung der Eltern während den Hypospadieoperationen Hautproben vom ventralen Anteil der Vorhaut entnommen. Zur Untersuchung der Langerhans Zellen kamen neben konventioneller Immunhistochemie wie oben beschrieben mit Verwendung von anti-CD207(Langerin) Antikörpern eine spezielle Technik zur Präparation von sogenannten „sheets“ zur getrennten Untersuchung von Epidermis und Dermis zum Einsatz. Die Methode der sheet-Präparation ist gut etabliert, in einem vorangegangenen Projekt (Haid, 2007; Dissertationsarbeit an der Medizinischen Universität Innsbruck) wurde diese Methode in einem Mausmodell angewandt. Dazu wurde in weiterer Folge eine methodologische Grundlagenarbeit im Sinne einer exakten Beschreibung des Laborprotokolls publiziert (Ober-Blöbaum, 2017). Die ursprüngliche Beschreibung geht auf Kitano zurück (Kitano, 1983). Für die vorliegende Arbeit wurde das Protokoll auf die Anwendung an humaner Vorhaut optimiert.

Die epidermalen und dermalen sheets wurden mittels Antikörpern gegen CD207 (Langerin) und HLA-DR sowie mittels rot (Alexa 596) bzw. grün (Alexa 488) gelabelten Sekundärantikörpern gefärbt. Ultradünnschnitte (5µm) aus Vollhautproben der selben Patienten wurden ebenfalls mit Antikörpern gegen CD207 (Langerin) unter Verwendung der automatisierten Roche®Ventana Technologie gefärbt. So konnte die Frequenz und die Morphologie der Langerhans Zellen mittels zweier Methoden unabhängig voneinander untersucht werden, um die Ergebnisse doppelt zu validieren. Die Zählung der Zellen erfolgte – sowohl auf sheets als auch auf Schnitten - mittels einer standardisierten Methode.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass – im Vergleich zu Vorhautproben von Knaben ohne Hypospadien – epidermale und dermale Langerhans Zellen bei Patienten mit Hypospadien in unveränderter Frequenz und Morphologie vorhanden sind. Dabei konnten wir weder beim Vergleich zwischen distalen und proximalen Hypospadieformen noch in Hinblick auf eine präoperative Androgenstimulation einen signifikanten Unterschied nachweisen.



Langerhans Zellen in der Epidermis von Knaben ohne Penisfehlbildung, mit distalen Hypospadien und mit proximalen Hypospadien. Immunfluoreszenzfärbung mittels Anti-HLA-DR und Anti-CD207 Antikörpern, IgG2 Isotypenkontrollen. Maßstabsleiste 60µm.

Wenn auch eine funktionelle Evaluation nicht möglich ist (humane Proben), kann aufgrund der unveränderten Mikroanatomie davon ausgegangen werden, dass auch die Funktion der Langerhans Zellen in Hypospadiepatienten entsprechend ihrer Frequenz und ihrem Phänotyp normal und im Vergleich zu Buben und Männern ohne Fehlbildung des äußeren Genitale unverändert ist - wahrscheinlich auch in Hinblick auf HIV und HPV Infektionen.

Der Androgen Rezeptor im Epithel und in subepithelialen glatten Muskelzellen der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien und Buried penis (Tack, Haid et al., J Ped Urol 2019)

Während der AR in frühen Phasen der Entwicklung des Genitaltuberkels und im Rahmen der Entwicklung der proximalen Harnröhre in erster Linie regulatorisch beteiligt ist, scheint er bei der Entwicklung der distalen Harnröhre und der Vorhaut im zweiten Trimester eine Schlüsselrolle zu spielen (Zheng, 2015; Favorito, 2012; van der Werff, 2000). In dieser Zeit der Embryonalentwicklung ist der AR auch im Epithel des sinus urogenitalis nachweisbar (Welsh, 2008). Zur physiologischen Entwicklung des äußeren männlichen Genitale ist weiterhin DHT (Dihydrotestosteron) als Ligand des AR sowie eine funktionierende Enzymkaskade notwendig – jede Malfunktion einer der grundlegenden Signalwege kann zur Ausprägung einer Hypospadien beitragen (van der Zanden, 2012).

Bei Patienten mit Hypospadien und anderen Fehlbildungen des Penis finden sich häufig auch andere Zeichen einer Untervirilisierung wie beispielsweise Kryptorchismus oder persistierende Müller-Gang Anteile, insbesondere der utriculus prostaticus, dessen Persistenz als zystische Raumforderung mit proximalen Hypospadien assoziiert ist (Hua, 2018; Devine, 1980).

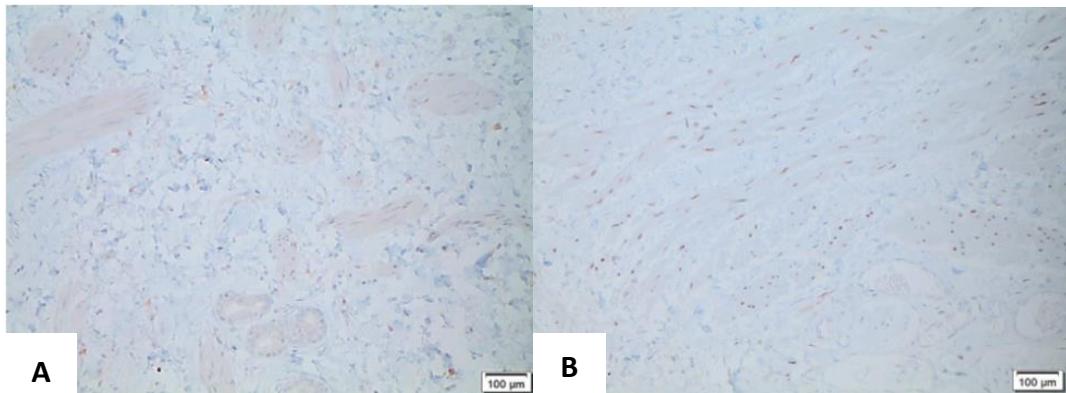
Analog zu den Erläuterungen bezüglich der beiden anderen Projekte muss auch betreffend den AR davon ausgegangen werden, dass seine Expression in allen embryonalen Keimblättern entscheidend für die physiologische Entwicklung des Penis ist. Zudem wird der AR im Verlauf der Kindheit abhängig von der Testosteronproduktion in einem bimodalen Verlauf in genitalem Gewebe exprimiert: Ab der zweiten Lebenswoche kommt es im Rahmen der sogenannten „Mini-Pubertät“ zu einem Androgen Anstieg bei dem auch der AR vermehrt nachweisbar wird (Kuiri-Hänninen, 2014); danach ist bis zum Pubertätseintritt kein AR – und keine relevante Konzentration von Androgenen nachweisbar. Dementsprechend verschwinden nach abgeschlossener Mini-Pubertät auch die (fetalen) Leydig-Zellen, erst beim Eintritt in die Pubertät kommt es wieder zum Auftreten adulter Leydig-Zellen (Prince, 2001).

In den bisherigen Publikationen zur AR Expression bei Hypospadiie Patienten konnte kein klarer Konsensus erreicht werden: in einigen fanden sich Unterschiede in der Expression, Transkription und Lokalisation im Vergleich zwischen Patienten mit einer Penisfehlbildung bzw. insbesondere mit Hypospadiie und Kontrollen, in anderen nicht (Pichler, 2013; Silva, 2013; Qiao, 2012; Vottero, 2011; Celayir, 2007; Bentvelsen, 1995). Zusätzlich zur AR

Expression im Epithel wurde in unserer Studie auch die AR Expression in den glatten Muskelzellen der subkutanen tunica dartos untersucht – auch diese scheint in die Embryopathogenese der Hypospadie und anderer Penisfehlbildungen involviert zu sein (Spnoit, 2015).

Analog zu den beiden anderen Studien wurden Vorhautbiopsien untersucht, die im Rahmen der Operationen entnommen wurden. Zur Analyse der AR-Expression im Epithel sowie im Dartosgewebe kam ebenso eine immunhistochemische Färbemethode zum Einsatz. Die besonders schwierig zu interpretierende Expression des AR machte eine in diesem Bereich neue Methodologie notwendig: angelehnt an die Rezeptoranalyse bei Mammakarzinom Präparaten wurde ein m-Quicks Score verwendet, der eine Quantifizierung sowohl der Färbeintensität als auch des Anteils der positiven Nuclei erlaubt. Diese Methode wurde in der immunhistochemischen Diagnostik des Mammakarzinoms erfolgreich gegen mehrere alternative Ansätze validiert (Detre, 1995). Dies ist die unseres Wissens erste Anwendung dieses Scores außerhalb der Mammadiagnostik. Deswegen erfolgte eine Analyse durch zwei unabhängige Untersucher, die gegenüber der Diagnose verblindet waren und die Ermittlung einer interobserver Variabilität.

Die Untersuchung erfolgte an 197 Proben von Hypospadie Patienten und 33 Proben von Buben, die aufgrund eines Buried Penis operiert wurden. Es zeigte sich eine niedrige interobserver Variabilität bezüglich der Scores zwischen den beiden Untersuchern. Die Auswertung erfolgte gemäß der Studienhypothese unter der Annahme einer altersabhängigen Expression nach Altersgruppen. Entsprechend der üblichen Indikationsstellung waren in der Altersgruppe <6 Monaten nicht ausreichend viele Patienten für eine statistische Analyse vorhanden. In allen anderen Altersgruppen >6 Monaten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der m-Quick Scores betreffend die epitheliale AR Expression und die AR Expression in den glatten Muskelzellen der Tunica Dartos festgestellt. Dies galt sowohl für die Patienten mit einer Hypospadie als auch für die mit Buried Penis. Auch der Vergleich zwischen proximalen und distalen Hypospadien erbrachte keinen Hinweis auf einen signifikanten Unterschied.



Immunhistochemische Färbung des AR in glatten Muskelzellen des Subkutangewebes der Vorhaut von Knaben mit Hypospadien: A keine AR Färbung in den Kernen der glatten Muskelzellen (m-Quicks = 0) B AR Färbung in >50% der Kerne der glatten Muskelzellen mit hoher Intensität (m-Quicks = 6)

Die Untersuchung der m-Quick Scores zeigte sowohl in den glatten Muskelzellen der tunica dartos als auch in der Epidermis eine klare bimodale, altersabhängige Verteilung: während des ersten Lebensjahres war ein Intensitätsgipfel feststellbar, danach eine Abnahme der Expression, die erst wieder im Pubertätsalter anstieg und dann oft stark ausgeprägt vorhanden war. Bei etwas eingeschränkter Aussagekraft aufgrund der nicht für alle Patienten verfügbaren Daten konnten wir keine Unterschiede in der AR Expression abhängig von einer zusätzlichen Hodenfehlage oder bei Knaben mit geringem Geburtsgewicht bzw. verminderter Länge (SGA) feststellen.

In dieser Studie konnte die Frage nach der AR Expression bei Patienten mit Fehlbildungen des Penis um ein weiteres, wesentliches Stück geklärt werden: Das Fehlen eines Unterschieds zwischen Kontrollen und Kindern mit Hypospadien oder buried Penis weist darauf hin, dass der AR – als Transkriptionsfaktor – bei den meisten Knaben abhängiger Teil eines großen Signalwegenetzwerkes ist. Seine unbestreitbare Rolle bei der Entstehung von Hypospadien scheint auch von assoziierten Faktoren abhängig zu sein. Weiterhin konnte in dieser Studie die Anwendbarkeit des m-Quick Scores dargestellt werden. Durch die hohe Zahl an Patienten und die dadurch mögliche Korrektur unserer Ergebnisse für das variable Alter der eingeschlossenen Kinder können die diskrepanten Befunde der Vorstudien zumindest teilweise erklärt werden.

Zusammenfassung

In den drei hier zusammengefassten Arbeiten wurde die Physiologie und Pathophysiologie der Vorhaut bei Kindern mit Hypospadien – und die AR Expression auch bei Kindern mit buried Penis – in Bezug auf drei Aspekte untersucht:

- Erstmals in humanem Gewebe erfolgte der Nachweis von möglichen Folgeerscheinungen embryonaler Ereignisse betreffend die Haut als ektodermal abstammendes Gewebe: Es konnten aberrante Expressionsmuster von FGF - und damit eines der wesentlichsten Signalwege in der Embryopathogenese der Hypospadie – nachgewiesen werden.
- Außerdem erfolgte erstmalig eine Untersuchung der Langerhans Zellen in Hinblick auf die Immunologie der Haut – hier konnte kein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Hypospadie nachgewiesen werden.
- Drittens erfolgte eine Analyse der Expression des AR im Epithel und – erstmals - auch in glatten Muskelzellen der Tunica dartos. Mittels einer in dieser Fragestellung neuen Methode konnte in einer im Vergleich zur bisher publizierten Literatur großen Gruppe von Patienten kein eindeutiger Einfluss der Ausprägung einer Hypospadie auf die bimodale, altersabhängige Expression gezeigt werden.

Ausblick und Perspektive

Die wohl wesentlichste Konsequenz aus diesen grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnissen sollte eine konsequente Weiterentwicklung in Hinblick auf klinisch relevante Endpunkte sein:

- Betreffend die hier beschriebene, alterierte Expression von FGF wäre eine Untersuchung im Tiermodell (es existiert ein murines FGF10 knock-out Modell für Hypospadien) denkbar. Damit könnten mögliche Implikationen bezüglich der Wundheilung untersucht werden und in weiterer Folge auch mögliche Effekte (neo)adjuvanter Hormontherapie auf den FGF Haushalt und die Wundheilung (Gredler, 2015).
- Eine weitere, relevante mögliche Anwendung wäre der Versuch FGF topisch adjuvant bei Patienten mit einem hohen Risiko für Wundheilungsstörungen einzusetzen. Dies wurde bereits bei Verbrennungspatienten und Patienten mit chronischen Ulcera erfolgreich unter Verwendung von rekombinantem FGF10 durchgeführt (Plichta, 2012).
- Die hier vorgestellten Daten implizieren in Hinblick auf die Funktion von Langerhans Zellen unter anderem zwar eine vergleichbare Suszeptibilität gegenüber HIV und HPV Infektionen. Der Stellenwert der Immunologie bei Individuen mit angeborenen Fehlbildungen des äußeren Genitale ist, was die Übertragung dieser Infektionskrankheiten betrifft aber in anderen Bereichen noch wenig untersucht: hier könnten PCR Untersuchungen bezüglich HPV in der Vorhaut erwachsener Patienten mit und ohne Hypospadie weitere klinisch relevante Erkenntnisse liefern.
- Die Befunde aus der Analyse der AR-Expression legen nahe, dass sich die AR-Synthese durch die externe Anwendung von Dihydrotestosteron bzw. eine i.m. Testosteron Behandlung induzieren lässt. Während es Daten zur präoperativen hormonellen Therapie im Rahmen der Hypospadiechirurgie gibt, wurde noch nicht untersucht, in welchem Ausmaß eine Reinduktion des AR Rezeptors basierend auf unterschiedlichen genetischen Voraussetzungen (e.g. FGF?) erfolgt. Tierexperimentelle Daten deuten auf einen ausgeprägt proinflammatorischen Effekt einer Testosteronanwendung hin mit der Folge einer prolongierten Wundheilung (Hofer, 2015). Die klinische Beobachtung, dass insbesondere bei proximalen Hypospadien die neoadjuvante Androgentherapie oft nur wenig Effekt hat bzw.

höhere Dosen benötigt werden um einen entsprechenden Effekt zu erzielen, könnte durch eine ausprägungsabhängige Unterschiedlichkeit in der Stimulierbarkeit der AR Expression bedingt sein (Snodgras, 2014).

Überdies legen die in unserer Untersuchung erhobenen Daten einen Einfluss des Geburtsgewichtes auf die hormonellen Regulationsmechanismen bei der Hypospadie nahe. Wie weit dies, insbesondere in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypospadie und Geburtsgewicht, ein Prädiktor für postoperative Komplikationen sein könnte ist derzeit noch unklar.

Originalarbeiten im Rahmen des Habilitationsprojektes

- **Haid B**, Pechriggl E, Nägele F, Webersinke G, Rammer M, Fritsch H, Oswald J. FGF8/10 and FGF receptor 2 expression in foreskin of children with hypospadias: an analysis of immunohistochemical expression patterns and gene transcription. *J Ped Urol*. 2019. In Press / online first. IF (2018) 1,736
- **Haid B**, Reider D, Nägele F, Spinoit AF, Pechriggl E, Romani N, Fritsch H, Oswald J. Langerhans cells in hypospadias: an analysis of Langerin (CD207) and HLA-DR on epidermal sheets and full thickness skin sections. *BMC Urology*. 2019; 19:114. IF (2018) 1,583
- Tack LJW, Praet M, Van Dorpe J, **Haid B**, Buelens S, Hoebeke P, Van Laecke E, Cools M, Spinoit AF. Androgen receptor expression in preputial dartos tissue correlates with physiological androgen exposure in congenital malformations of the penis and in controls. *J Ped Urol*. 2019. In Press. IF (2018) 1,736

Kongressbeiträge und Grundlagenpublikationen im Zusammenhang mit dem Habilitationsprojekt

- **Haid B**, Nägele F, Pechriggl E, Oswald J. FGF8/10/2R in human hypospadias Foreskin: does their expression pattern differ from normal foreskin? *ESPU Annual Meeting* 2017, Barcelona, Spanien
- Nägele F, **Haid B**, Oswald J, Pechriggl E. The role of FGFs in the early development of the urethra: rare insights from human fetal specimens. *ESPU Annual Meeting* 2017, Barcelona, Spanien
- **Haid B**, Reider D, Spinoit AF, Nägele F, Pechriggl E, Oswald J. Is the skin immune system compromised in patients with hypospadias? *33rd Congress of the EAU* 2018, Kopenhagen.

- **Haid B**, Reider D, Spinoit AF, Nägele F, Pechriggl E, Oswald J, Romani N. Langerhans cells in hypospadias: is the skin immune system compromised in patients with this congenital malformation? LC2017, 15th Workshop on Langerhans Cells, Zuckerman Research Center Auditorium, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, 6.-8. Ocotber 2017.
- Ober-Blöbaum JL, Ortner D, **Haid B**, Brand A , Tripp C, Clausen BE, Stoizner P. Monitoring skin dendritic cells in steady state and inflammation by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. In Methods in Molecular Biology: Inflammation methods and protocols. 2017 1559: 37-53. New York: Springer Science and Business Media.
- **Haid B**. Attempts to characterize migration of murine Langerhans cells in the steady state. Dissertation an der Medizinischen Universität Innsbruck. 2007.

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
BMP	bone morphogenetic protein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CD	cluster of differentiation
DC-SIGN	dendritic-cell specific intercellular adhesion molecule 3 grabbing non-integrin
DHT	Dihydrotestosteron
ER	Östrogenrezeptor
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor Rezeptor 2
GW	Gestationswoche
GLI	glioma associated oncogene
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPV	Humanes Papillom Virus
HOX	homeobox
Ig	Immunglobulin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase Kettenreaktion
rtPCR	reverse transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SF1	splicing factor 1
SGA	small for gestational age
SHH	Sonic Hedgehog
Wnt	Wingless Int-1 Signaltransduktionskaskade
WT1	Wilms Tumor 1

Literaturverzeichnis

1. Atmoko W, Shalmont G, Situmorang GR, Wahyudi I, Tanurahardja B, Rodjani A. Abnormal dartos fascia in buried penis and hypospadias: Evidence from histopathology. *Journal of Pediatric Urology* 2018;0. doi:10.1016/j.jpurol.2018.04.034.
2. Bagheri-Fam S, Bird AD, Zhao L, Ryan JM, Yong M, Wilhelm D, et al. Testis Determination Requires a Specific FGFR2 Isoform to Repress FOXL2. *Endocrinology* 2017;158:3832–43. doi:10.1210/en.2017-00674.
3. Beleza-Meireles A, Lundberg F, Lagerstedt K, Zhou X, Omrani D, Frisén L, et al. FGFR2, FGF8, FGF10 and BMP7 as candidate genes for hypospadias. *Eur J Hum Genet* 2007;15:405–10. doi:10.1038/sj.ejhg.5201777.
4. Bentvelsen FM, Brinkmann AO, van der Linden JE, Schroder FH, Nijman JM. Decreased immunoreactive androgen receptor levels are not the cause of isolated hypospadias. *Br J Urol* 1995;76:384–8. doi:10.1111/j.1464-410x.1995.tb07719.x.
5. Bergman JEH, Loane M, Vrijheid M, Pierini A, Nijman RJM, Nijman RJM, et al. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry-based study. *World J Urol* 2015;33:2159–67. doi:10.1007/s00345-015-1507-6.
6. Carmichael SL, Shaw GM, Lammer EJ. Environmental and genetic contributors to hypospadias: A review of the epidemiologic evidence. *Birth Defects Research Part a: Clinical and Molecular Teratology* 2012;94:499–510. doi:10.1002/bdra.23021.
7. Carmichael SL, Ma C, Choudhry S, Lammer EJ, Witte JS, Shaw GM. Hypospadias and Genes Related to Genital Tubercl and Early Urethral Development. *J Urol* 2013;1–9. doi:10.1016/j.juro.2013.05.061.

8. Celayir S, Eliçevik M, Tireli G, Dervisoğlu S, Sander S. Expression of estrogen and androgen receptors in children with hypospadias: preliminary report. *Arch Androl* 2007;53:83–5. doi:10.1080/01485010601166862.
9. Da Silva DM, Woodham AW, Rijkee LK, Skeate JG, Taylor JR, Koopman ME, et al. Human papillomavirus-exposed Langerhans cells are activated by stabilized Poly-I:C. *Papillomavirus Research* 2015;1:12–21. doi:10.1016/j.pvr.2015.05.001.
10. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995;48:876–8. doi:10.1136/jcp.48.9.876.
11. Devine CJ, Gonzalez-Serva L, Stecker JF, Devine PC, Horton CE. Utricular configuration in hypospadias and intersex. *J Urol* 1980;123:407–11. doi:10.1016/s0022-5347(17)55959-5.
12. De Witte L, Nabatov A, Geijtenbeek TBH. Distinct roles for DC-SIGN+-dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:12–9. doi:10.1016/j.molmed.2007.11.001.
13. Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human Papillomavirus Virus-Like Particles Do Not Activate Langerhans Cells: A Possible Immune Escape Mechanism Used by Human Papillomaviruses. *J Immunol* 2002;169:3242–9. doi:10.4049/jimmunol.169.6.3242.
14. Favorito LA, Balassiano CM, Costa WS, Sampaio FJB. Development of the human foreskin during the fetal period. *Histol Histopathol* 2012;27:1041–5. doi:10.14670/HH-27.1041.
15. Ganor Y, Bomsel M. HIV-1 Transmission in the Male Genital Tract. *American Journal of Reproductive Immunology* 2011;65:284–91. doi:10.1111/j.1600-0897.2010.00933.x.

16. Gredler ML, Seifert AW, Cohn MJ. Tissue-specific roles of Fgfr2 in development of the external genitalia. *Development* 2015;142:2203–12. doi:10.1242/dev.119891.
17. Guan T, Dominguez CX, Amezquita RA, Laidlaw BJ, Cheng J, Henao-Mejia J, et al. ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8+ T cell fates. *J Exp Med* 2018;215:1153–68. doi:10.1084/jem.20171352.
18. Haid B. Attempts to characterize migration of murine Langerhans cells in the steady state. Dissertation an der Medizinischen Universität Innsbruck. 2007.
19. Haid B, Pechriggl E, Nägele F, Dudas J, Webersinke G, Rammer M, et al. FGF8, FGF10 and FGF receptor 2 in foreskin of children with hypospadias: an analysis of immunohistochemical expression patterns and gene transcription. *Journal of Pediatric Urology* 2019;1–10. doi:10.1016/j.jpurol.2019.10.007.
20. Haid B, Reider D, Nägele F, Spinoit A-F, Pechriggl E, Romani N, et al. Langerhans cells in hypospadias: an analysis of Langerin (CD207) and HLA-DR on epidermal sheets and full thickness skin sections. *BMC Urol* 2019;19:114. doi:10.1186/s12894-019-0551-8.
21. Harada M, Omori A, Nakahara C, Nakagata N, Akita K, Yamada G. Tissue-specific roles of FGF signaling in external genitalia development. *Dev Dyn* 2015;244:759–73. doi:10.1002/dvdy.24277.
22. Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M, et al. Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 2000;127:2471–9.
23. Hofer MD, Cheng EY, Bury MI, Xu W, Hong SJ, Kaplan WE, et al. Reconstructive Urology Androgen Supplementation in Rats Increases the Inflammatory Response and Prolongs Urethral Healing. *Urology* 2015;85:691–7. doi:10.1016/j.urology.2014.11.025.

24. Hua XG, Hu R, Hu CY, Li FL, Jiang W, Zhang XJ. Associations between hypospadias, cryptorchidism and anogenital distance: Systematic review and meta-analysis. *Andrologia* 2018;50:e13152. doi:10.1111/and.13152.
25. Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermal sheet by dispase. *Br J Dermatol* 1983;108:555–60. doi:10.1111/j.1365-2133.1983.tb01056.x.
26. Kuri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr* 2014;82:73–80. doi:10.1159/000362414.
27. Li J, Willingham E, Baskin LS. Gene expression profiles in mouse urethral development. *BJU Int* 2006;98:880–5. doi:10.1111/j.1464-410X.2006.06435.x.
28. Maddaluno L, Urwyler C, Werner S. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* 2017;144:4047–60. doi:10.1242/dev.152587.
29. Marrocco G, Grammatico P, Vallasciani S, Gulia C, Zangari A, Marrocco F, et al. Environmental, parental and gestational factors that influence the occurrence of hypospadias in male patients. *Journal of Pediatric Urology* 2015;11:12–9. doi:10.1016/j.jpurol.2014.10.003.
30. Meyer M, Müller A-K, Yang J, Moik D, Ponzio G, Ornitz DM, et al. FGF receptors 1 and 2 are key regulators of keratinocyte migration in vitro and in wounded skin. *Journal of Cell Science* 2012;125:5690–701. doi:10.1242/jcs.108167.
31. Nägele F, Haid B, Dudas J, Haim A, Blumer MJF, Oswald J, et al. The role of FGFs in the early development of the urethra: rare insights from human fetal specimens. Annual Meeting of the European Society of Pediatric Urology (ESPU), 2017.

32. Oladipupo SS, Smith C, Santeford A, Park C, Sene A, Wiley LA, et al. Endothelial cell FGF signaling is required for injury response but not for vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:13379–84. doi:10.1073/pnas.1324235111.
33. Pechriggl EJ, Bitsche M, Blumer MJF, Fritsch H. The male urethra: Spatiotemporal distribution of molecular markers during early development. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 2013;195:260–71. doi:10.1016/j.aanat.2013.01.008.
34. Petiot A, Perriton CL, Dickson C, Cohn MJ. Development of the mammalian urethra is controlled by Fgfr2-IIIb. *Development* 2005;132:2441–50. doi:10.1242/dev.01778.
35. Pichler R, Djedovic G, Klocker H, Heidegger I, Strasak A, Loidl W, et al. Quantitative measurement of the androgen receptor in prepuces of boys with and without hypospadias. *BJU International* 2013;112:265–70. doi:10.1111/j.1464-410X.2012.11731.x.
36. Prince FP. The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *Journal of Endocrinology* 2001;168:213–6. doi:10.1677/joe.0.1680213.
37. Ober-Blöbaum JL, Ortner D, Haid B, Brand A, Tripp C, Clausen BE, et al. Monitoring Skin Dendritic Cells in Steady State and Inflammation by Immunofluorescence Microscopy and Flow Cytometry. *Methods Mol Biol* 2017;1559:37–52. doi:10.1007/978-1-4939-6786-5_3.
38. Plichta JK, Radek KA. Sugar-coating wound repair: a review of FGF-10 and dermatan sulfate in wound healing and their potential application in burn wounds. *J Burn Care Res* 2012;33:299–310. doi:10.1097/BCR.0b013e318240540a.
39. Qiao L, Tasian GE, Zhang H, Cao M, Ferretti M, Cunha GR, et al. Androgen receptor is overexpressed in boys with severe hypospadias, and ZEB1 regulates androgen receptor expression in human foreskin cells. *Pediatr Res* 2012;71:393–8.

doi:10.1038/pr.2011.49.

40. Richardson R, Metzger M, Knyphausen P, Ramezani T, Slanchev K, Kraus C, et al. Re-epithelialization of cutaneous wounds in adult zebrafish combines mechanisms of wound closure in embryonic and adult mammals. *Development* 2016;143:2077–88.
41. Schuster C, Vaculik C, Fiala C, Meindl S, Brandt O, Imhof M, et al. HLA-DR+ leukocytes acquire CD1 antigens in embryonic and fetal human skin and contain functional antigen-presenting cells. *J Exp Med* 2009;206:169–81. doi:10.1084/jem.20081747.
42. Schuster C, Mildner M, Mairhofer M, Bauer W, Fiala C, Prior M, et al. Human embryonic epidermis contains a diverse Langerhans cell precursor pool. *Development* 2014;141:807–15. doi:10.1242/dev.102699.
43. Silva TS, Richeti F, Cunha DPPS, Amarante ACM, de Souza Leão JQ, Longui CA. Androgen receptor mRNA measured by quantitative real time PCR is decreased in the urethral mucosa of patients with middle idiopathic hypospadias. *Horm Metab Res* 2013;45:495–500. doi:10.1055/s-0033-1333717.
44. Snodgrass WT, Villanueva C, Granberg C, Bush NC. Objective use of testosterone reveals androgen insensitivity in patients with proximal hypospadias. *J Ped Urol* 2014;10:118–22. doi:10.1016/j.jpurol.2013.07.006.
45. Spinoit AF, Poelaert F, Groen LA, Van Laecke E, Hoebeke P. Hypospadias repair in a single reference Centre: Long term follow-up is mandatory to detect the real complication rate! *J Urol* 2013;189:1–16. doi:10.1016/j.juro.2012.12.100.
46. Spinoit A-F, Poelaert F, Van Praet C, Groen L-A, van Laecke E, Hoebeke P. Grade of hypospadias is the only factor predicting for re-intervention after primary hypospadias repair: a multivariate analysis from a cohort of 474 patients. *J Pediatr Urol* 2015;11:70.e1–6. doi:10.1016/j.jpurol.2014.11.014.

47. Spinoit AF, Van Praet C, Groen LA, Van Laecke E, Praet M, Hoebeke P. Congenital Penile Pathology is Associated with Abnormal Development of the Dartos Muscle: A Prospective Study in a Large Cohort of Children Undergoing Primary Penile Surgery at a Tertiary Referral Center. *J Urol* 2015;193:1–5. doi:10.1016/j.juro.2014.10.090.
48. Steinman RM. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007;37:S53–
49. S60. doi:10.1002/eji.200737400.
50. Tack LJW, Praet M, Van Dorpe J, Haid B, Buelens S, Hoebeke P, et al. Androgen receptor expression in preputial dartos tissue correlates with physiological androgen exposure in congenital malformations of the penis and in controls. *Journal of Pediatric Urology* 2019;1–19. doi:10.1016/j.jpurol.2019.10.031.
51. Tripp CH, Chang-Rodriguez S, Stoitzner P, Holzmann S, Stössel H, Douillard P, et al. Ontogeny of Langerin/CD207 Expression in the Epidermis of Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 2004;122:670–2. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22337.x.
52. van den Berg LM, Geijtenbeek TBH. Antiviral immune responses by human langerhans cells and dendritic cells in HIV-1 infection. *Adv Exp Med Biol* 2013;762:45–70. doi:10.1007/978-1-4614-4433-6_2.
53. van der Werff JF, Nievelstein RA, Brands E, Luijsterburg AJ, Vermeij-Keers C. Normal development of the male anterior urethra. *Teratology* 2000;61:172–83. doi:10.1002/(SICI)1096-9926(200003)61:3<172::AID-TERA4>3.0.CO;2-B.
54. van der Zanden LFM, Galesloot TE, Feitz WFJ, Brouwers MM, Shi M, Knoers NVAM, et al. Exploration of gene-environment interactions, maternal effects and parent of origin effects in the etiology of hypospadias. *J Urol* 2012;188:2354–60. doi:10.1016/j.juro.2012.08.033.

55. Vottero A, Minari R, Viani I, Tassi F, Bonatti F, Neri TM, et al. Evidence for Epigenetic Abnormalities of the Androgen Receptor Gene in Foreskin from Children with Hypospadias. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1953–62. doi:10.1210/jc.2011-0511.
56. Welsh M, Saunders PTK, Fiskin M, Scott HM, Hutchison GR, Smith LB, et al. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest* 2008;118:1479–90. doi:10.1172/JCI34241.
57. Zheng Z, Armfield BA, Cohn MJ. Timing of androgen receptor disruption and estrogen exposure underlies a spectrum of congenital penile anomalies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:E7194–203. doi:10.1073/pnas.1515981112.
58. Zhou Y, Peng J, Cao X, Yan C, Huang F, Shen L, et al. Retardation of Preputial Wound Healing in Rats with Hypospadias Induced by Flutamide. *J Invest Surg* 2018;33:1–8. doi:10.1080/08941939.2018.1483448.

Dank

Dank gilt meinem Lehrer und Mentor **Prim. Univ. Doz. Dr. med. univ. Josef Oswald**. Er hat mich gefördert, geduldig begleitet und mir oft die richtige Richtung gewiesen. In seinem unerschöpflich erscheinenden Forscherdrang und seinem konsequenten, wissenschaftlichen Hinterfragen unserer täglichen chirurgischen und klinischen Entscheidungen und deren embryologischen und pathophysiologischen Hintergründe wird er mir immer ein Vorbild bleiben.

Em. Univ. Prof. Dr. rer. nat. Nikolaus Romani hat während meiner Dissertation an der Medizinischen Universität Innsbruck meine Begeisterung für die Immunologie der Haut geweckt und mir grundlegendes Rüstzeug für die Arbeit im Labor – und die wissenschaftliche Arbeit Insgesamt – mitgegeben. Er hat mir die Untersuchung zu den Langerhans Zellen ermöglicht und mich dabei geduldig unterstützt.

Em. Prim. Univ. Doz. Dr. med. Marcus Riccabona hat mich während der wissenschaftlichen – und klinischen – Arbeit stets mit klugem Rat unterstützt und mir die Möglichkeit eröffnet, an der Urologischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München in der Lehre tätig zu sein. Dort erfuhr ich von Seiten des Klinikvorstandes, **Univ. Prof. Dr. med. Christian Stief**, von **Univ. Prof. Dr. Raphaela Waidelich** und von **Baronin Kerstin von der Recke** großartige Unterstützung.

Zwei der hier zusammengefassten Arbeiten sind in Zusammenarbeit mit **Prof. Dr. Françoise Spinoit, PhD** (Ghent, Belgien) entstanden. In unzähligen, langen Gesprächen und Diskussionen konnten wir Ideen weiterentwickeln und uns gegenseitig über Rückschläge hinweghelfen.

Meinen Koautoren gebührt ebenso herzlicher Dank. Exemplarisch hervorgehoben sei an dieser Stelle **Dr. med. univ. Felix Nägele**, ohne ihn wäre die Laborarbeit wohl kaum erfolgreich möglich gewesen.

Den Funken für mein Interesse an der Wissenschaft – und an der Medizin – hat mein Vater, **em. Univ. Doz. Dr. med. univ. Anton Haid** in mir gezündet.

Ohne die akribische Arbeit und die großartige Unterstützung der Kolleginnen und Kollegen im Labor für Molekulargenetische Diagnostik des Ordensklinikums Linz (Leitung: **Dr. Gerald Webersinke**) den Labors der Univ. Klinik für Dermatologie und Venerologie (Leitung: **Univ. Prof. Dr. Matthias Schmuth**) sowie des Departments für Anatomie, Histologie und Embryologie der Medizinischen Universität Innsbruck (Leitung: **Univ. Prof. Dr. Helga Fritsch**) wäre dieses Projekt nicht möglich gewesen.

Ebenso möchte ich mich bei den **Kolleginnen und Kollegen der Abteilung für Kinderurologie am Ordensklinikum in Linz** bedanken, welche mir – wie auch die **Krankenhausverwaltung des Ordensklinikums** – jederzeit großes Verständnis und bedingungslose Unterstützung für meine wissenschaftliche Arbeit entgegenbrachten.

Quellenverweise auf die Originalarbeiten im Rahmen des Habilitationsprojektes

- Haid B, Pechriggl E, Nägele F, Dudas J, Webersinke G, Rammer M, Fritsch H and Oswald J. FGF8, FGF10 and FGF receptor 2 in foreskin of children with hypospadias: an analysis of immunohistochemical expression patterns and gene transcription. *J Pediatr Urol* 2020; 16(1): 41.e1-41.e10. doi:10.1016/j.jpurol.2019.10.007
- Haid B, Reider D, Nägele F, Spinoit AF, Pechriggl E, Romani N, Fritsch H and Oswald J. Langerhans cells in hypospadias: an analysis of Langerin (CD207) and HLA-DR on epidermal sheets and full thickness skin sections. *BMC Urol* 2019; 19(1): 114. doi:10.1186/s12894-019-0551-8
- Tack LJW, Praet M, Van Dorpe J, Haid B, Buelens S, Hoebeke P, Van Laecke E, Cools M and Spinoit AF. Androgen receptor expression in preputial dartos tissue correlates with physiological androgen exposure in congenital malformations of the penis and in controls. *J Pediatr Urol* 2020; 16(1): 43.e1-43.e8. doi:10.1016/j.jpurol.2019.10.031