

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

Funktionelle Analysen definierter Mutationen im Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor-1

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Isabel Mönig
aus Washington DC

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Olaf Hiort
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Michael Kasperkiewicz
3. Berichterstatter: Prof. Dr. med. St. Wudy

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.01.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1.	Die physiologische Geschlechtsentwicklung.....	1
1.2.	Molekulare Mechanismen in der Geschlechtsentwicklung im besonderen Hinblick auf die Rolle von SF-1.....	4
1.3.	Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung – <i>Differences of sex development</i> (DSD).....	7
1.4.	<i>NR5A1</i> -Mutationen als Ursache von Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung.....	9
1.5.	Struktur und Regulation der Aktivität von SF-1	11
1.6.	Fragestellung.....	14
2.	Materialien und Methoden	16
2.1.	Patientinnen und Patienten.....	16
2.2.	Materialien	20
2.2.1.	Bakterien- und HeLa-Zellen.....	20
2.2.2.	Plasmide	20
2.3.	Methoden	22
2.3.1.	Bakterienkultur	22
2.3.2.	Klonierung	23
2.3.3.	DNA-Isolierung	27
2.3.4.	Sequenzierung der Plasmid-DNA	28
2.3.5.	Zellkultur.....	29
2.3.6.	Transfektion.....	30
2.3.7.	Western Blot.....	32
2.3.8.	RNA-Isolierung	35
2.3.9.	Isolierung von Kern- und Zytoplasmaextrakten.....	37
2.3.10.	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	38
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Transaktivierungsassays	42
3.2.	Western Blot.....	44
3.3.	RNA-Isolierung und Reverse Transkription	46
3.4.	Intrazelluläre Lokalisation der SF-1-Proteine	49
3.5.	Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von SF-1.....	51
4.	Diskussion.....	55
4.1.	Möglichkeiten und Grenzen der Transaktivierungsassays	55

4.1.1. Begrenzte Zahl der untersuchten Promotoren	55
4.1.2. Eingeschränkte Übertragbarkeit von <i>in vitro</i> -Ergebnissen.....	56
4.1.3. Zusammenfassung zur Methodik.....	58
4.2. Strukturelle Analyse der einzelnen Mutationen	58
4.2.1. Korrelation zwischen der Lage der Mutation im Protein und dem Phänotyp.....	60
4.2.2. Einschränkung der nukleären Lokalisation durch Mutationen in der DBD	61
4.3. Phänotypische Variabilität bei Patientinnen und Patienten mit <i>NR5A1</i> - Mutationen	62
4.3.1. Gly146Ala-Polymorphismus als Modulator des phänotypischen Schweregrades	65
4.3.2. Fehlende Korrelation zwischen AMH-Werten und Müller-Gangs- Regression als Merkmal von <i>NR5A1</i> -Mutationen	65
4.3.3. Variable pränatale Virilisierung und spontane Pubertätsentwicklung	67
4.3.4. Bedeutung der Gonadenhistologie für den Virilisierungsgrad	69
4.4. Tendenz zur malignen Entartung bei Gonadendysgenese durch <i>NR5A1</i> -Mutationen.....	71
4.5. Ausblick	71
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	74
7. Anhang.....	86
8. Danksagung	101
9. Lebenslauf.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane	3
Abb. 2: Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane.....	3
Abb. 3: Schema der Angriffspunkte von SF-1 und anderen Transkriptionsfaktoren in der Geschlechtsentwicklung.....	6
Abb. 4: Struktur des SF-1-Proteins	13
Abb. 5: Verteilung der neuen Mutationen im SF-1-Protein	19
Abb. 6: Aufbau der Reportergene AMH-Luc und STAR-Luc.....	22
Abb. 7: Schema der Mutagenese-PCR.....	25
Abb. 8: Restriktionsverdau und Ligation am Beispiel der Mutation c.118C>A	26
Abb. 9: Schema des Transfektionsassays	32
Abb. 10: EMSA-Reaktionsansätze	40
Abb. 11: Relative Transaktivierung des <i>AMH</i> - und <i>STAR</i> -Promotors durch SF-1.....	43
Abb. 12: Darstellung von SF-1 mittels Anti-cMyc im Western Blot.....	45
Abb. 13: Bestätigung des Einsatzes gleicher Proteinmengen im Western Blot	45
Abb. 14: RNA-Qualitätskontrolle I	47
Abb. 15: RNA-Qualitätskontrolle II	48
Abb. 16: Reverse Transkription (RT).....	48
Abb. 17: Detektion der Zytoplasma- und Kernextrakte im Western Blot	50
Abb. 18: Kontrolle der im EMSA verwendeten SF-1-Proteinmengen.....	51
Abb. 19: Darstellung der DNA-Bindungskapazität von SF-1 im EMSA.....	54

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: DSD-Klassifikation	9
----------------------------------	---

Abbildungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF-1/-2	Aktivierungsdomäne-1/-2
AMH	Anti-Müller-Hormon
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
CAIS	komplette Androgenresistenz (Complete Androgen Insensitivity Syndrom)
CMV	Cytomegalie-Virus
d.p.o.	Tage nach der Ovulation (Days past ovulation)
DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dest.	Destilliert
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHH	Desert Hedgehog
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSD	Differences/disorders of sex development
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FBS	Fetales Kälberserum (Fetal Bovine Serum)
FGF9	Fibroblast Growth Factor 9
FOG2	Friend of GATA 2

FOXL2	Forkhead Box L2
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-4	GATA binding protein 4
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HeLa	Zervix Krebszelllinie aus der Patientin Henrietta Lacks
HRE	Hormon-responsive Elemente
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase)
HSD17B3	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
INSL3	Insulin-like Faktor 3
kDa	Kilodalton
KE	Kernextrakte
L	Liter
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
LHX1	LIM Homebox Protein 1
LRH-1	Liver Receptor Homolog-1
m	Milli
M	Molar
min	Minute
n	Nano
NMD	Nonsense-mediated mRNA Decay
NR5A1	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
p	Pico
PAIS	Partielle Androgenresistenz (Partial Androgen Insensitivity Syndrom)
Pat.	Patient
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase-Chain-Reaction)
POI	Primäre Ovarialinsuffizienz
PTGDS	Prostaglandin D2 Synthase

RIN	RNA Integrity Number
RLU	Relative Lichteinheiten (Relative Light Units)
RNA	Ribonukleinsäure
RSP01	R-Spondin 1
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SF-1	Steroidogenic Factor-1
SOX9	Sry-related HMG Box-9
SP1	Specifity protein 1
SRY	Sex-determining region of the Y chromosome
STAR	Steroidogenic acute regulatory-Protein
SUMO	Small ubiquitin like modifier
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WNT4	Wnt Family Member 4
WT	Wildtyp
WT-1	Wilms-Tumor-1
ZE	Zytoplasmaextrakte

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Die physiologische Geschlechtsentwicklung

Das biologische Geschlecht eines Menschen definiert sich über verschiedene Schritte in der Embryonalentwicklung. Bei der Befruchtung wird zunächst das chromosomale Geschlecht festgelegt. Physiologischerweise wird dabei ein männlicher Organismus durch den Karyotyp 46,XY und ein weiblicher Organismus durch den Chromosomensatz 46,XX determiniert. Je nach vorliegenden Geschlechtschromosomen differenzieren sich dann die entsprechenden Keimdrüsen und legen somit das gonadale Geschlecht fest. Die von den Gonaden produzierten Hormone führen schließlich zur Ausprägung der äußeren und inneren Geschlechtsorgane, auf deren Grundlage meist die Zuordnung eines Neugeborenen zum weiblichen oder männlichen Geschlecht erfolgt. Von diesen rein biologischen Definitionen des Geschlechtes muss unter anderem das psychische Geschlecht abgegrenzt werden, also die Geschlechtsidentität einer Person. Aus der Kombination dieser Merkmale leitet sich wiederum das soziale Geschlecht ab, welches die geschlechtliche Rolle, die eine Person in der Gesellschaft einnimmt, beschreibt.

Zu Beginn der Entwicklung des biologischen Geschlechtes liegen sowohl die inneren als auch die äußeren Geschlechtsorgane zunächst bei beiden Geschlechtern in einem indifferenten Stadium vor. Erst durch den Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren und Hormone kommt es im Laufe der Embryonalentwicklung zur geschlechtlichen Differenzierung. Einen Überblick liefern die Abbildungen 1 und 2.

Die Entwicklung der Sexualorgane beginnt in der 5. Gestationswoche mit der Entstehung der Genitalleisten aus dem Mesonephros. Im mittleren Drittel der Genitalleisten kommt es zur Proliferation des Epithels und damit zur Bildung der eigentlichen Gonadenanlage. Diese enthält zum einen somatische Zellen. Dabei entwickeln sich die Stützzellen im weiteren Verlauf zu Sertoli-Zellen beim XY- und zu Granulosa-Zellen beim XX-Embryo, die steroidhormonproduzierenden Zwischenzellen zu Leydig-Zellen im XY- und zu Theka-Zellen im XX-Embryo. Zum anderen wandern ab Ende der 5. Woche primordiale Keimzellen in die Gonadenanlage ein. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine geschlechtliche Differenzierung stattgefunden hat, wird die Gonade auch als ‚bipotent‘ bezeichnet (Überblick bei [104]).

In einem Embryo mit einem Y-Chromosom wird ab der 6. Woche das *SRY* (*sex-determining region of the Y chromosome*)-Gen exprimiert. Der Transkriptionsfaktor SRY wurde früher auch ‚Hoden-determinierender Faktor‘ genannt, da er einerseits direkt die Differenzierung der bipotenten Gonade in Richtung Hoden beeinflusst, andererseits

weitere Gene aktiviert, die für die Hodenentwicklung wichtig sind. In einem Embryo ohne Y-Chromosom wird kein SRY exprimiert, sodass diese Entwicklungsschritte nicht aktiviert werden. Verschiedene X-chromosomale Gene, wie beispielsweise das *WNT4*-Gen, tragen zur Differenzierung der bipotenten Gonade hin zu Ovarien bei. Im Gegensatz zur Hodenentwicklung sind bislang jedoch deutlich weniger Gene bekannt, welche die Entwicklung der Ovarien beeinflussen [41].

Ebenfalls aus dem Mesonephros entwickeln sich die Urnierengänge (Wolff-Gänge) und die Ductus paramesonephrici (Müller-Gänge). Sowohl im XY- als auch im XX-Embryo sind beide Gänge während der 5. und 6. Gestationswoche vorhanden und liegen somit ebenso zunächst in einem indifferenten Stadium vor. Ab der 6. Woche produzieren die Sertoli-Zellen in den Hoden das Anti-Müller-Hormon (AMH), welches die Regression der Müller-Gänge bewirkt. In einem XX-Embryo wird kein AMH gebildet, sodass sich die Müller-Gänge zu Eileitern, Uterus und oberer Vagina entwickeln. Zudem beginnt bei einem XY-Embryo in der 8. Gestationswoche die Testosteronproduktion in den Leydig-Zellen. Testosteron bewirkt über die Bindung an den Androgenrezeptor die Differenzierung des Wolff-Gangs in den Ductus deferens, den Ductus ejaculatorius, den Ductus epididymidis, die Glandula vesiculosa sowie Teile des Nebenhodens. Außerdem stimuliert Testosteron im weiteren Verlauf die Sertoli-Zellproliferation und ist am Hodendescensus beteiligt. Durch die Abwesenheit von Testosteron bilden sich die Wolff-Gänge in einem XX-Embryo zurück.

Testosteron steuert ebenfalls die Differenzierung der äußeren Geschlechtsorgane. Zunächst liegt auch hier zwischen der 4. und 7. Gestationswoche ein indifferentes Stadium vor, wobei beide Geschlechter einen Genitalhöcker, Genitalfalten sowie Genitalwülste aufweisen. Unter dem Einfluss von Testosteron kommt es zur Verlängerung des Genitalhöckers, welcher später die Glans penis darstellt. Durch Verschmelzung der Genitalfalten werden die Pars spongiosa der Urethra sowie die Corpora cavernosa und das Corpus spongiosum des Penis gebildet. Die Genitalwülste fusionieren zum Skrotum. Die Steuerung der Entwicklung der weiblichen äußeren Geschlechtsorgane hingegen ist im Detail ungeklärt. Es ist anzunehmen, dass Östrogene pränatal keinen Einfluss auf die Differenzierung haben. Lediglich die Abwesenheit von Testosteron scheint zur Entwicklung der weiblichen äußeren Genitalien zu führen. Dabei bildet der Genitalhöcker die Klitoris, die Genitalfalten entwickeln sich zu den Labia minora und die Genitalwülste bilden die Labia majora (Überblick bei [41,71]).

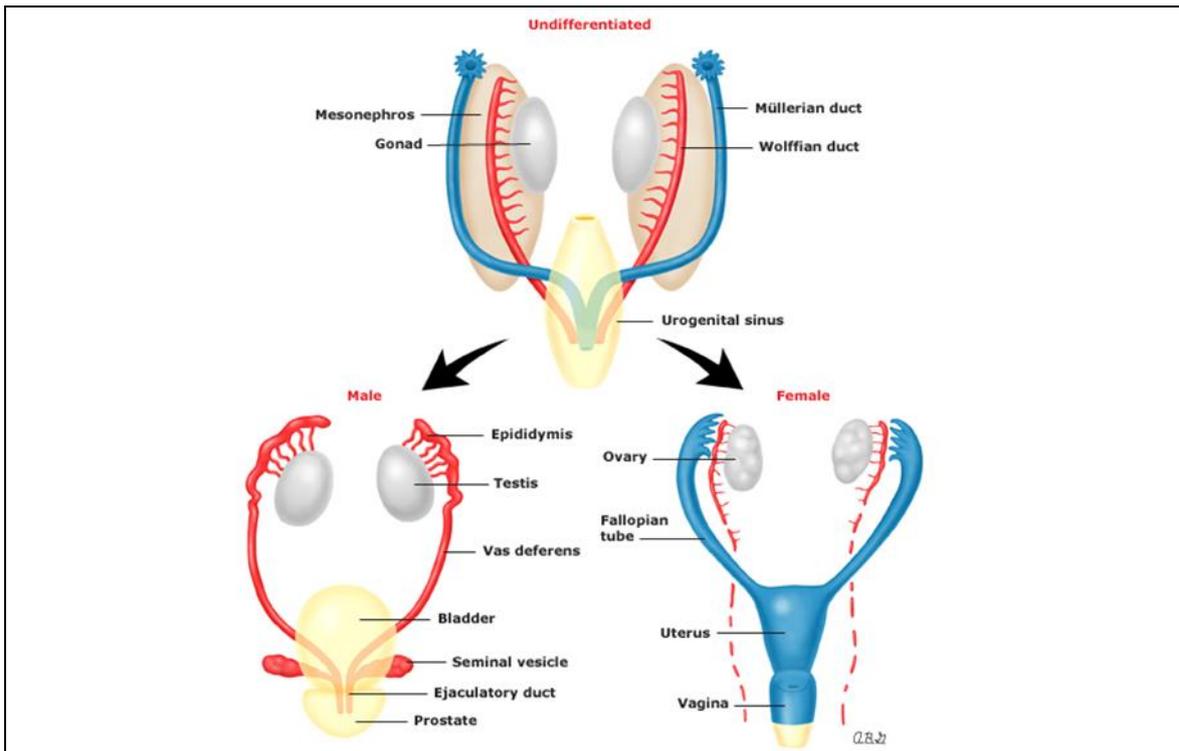


Abb. 1: Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane
(Verwendung mit Erlaubnis von UpToDate® [135])

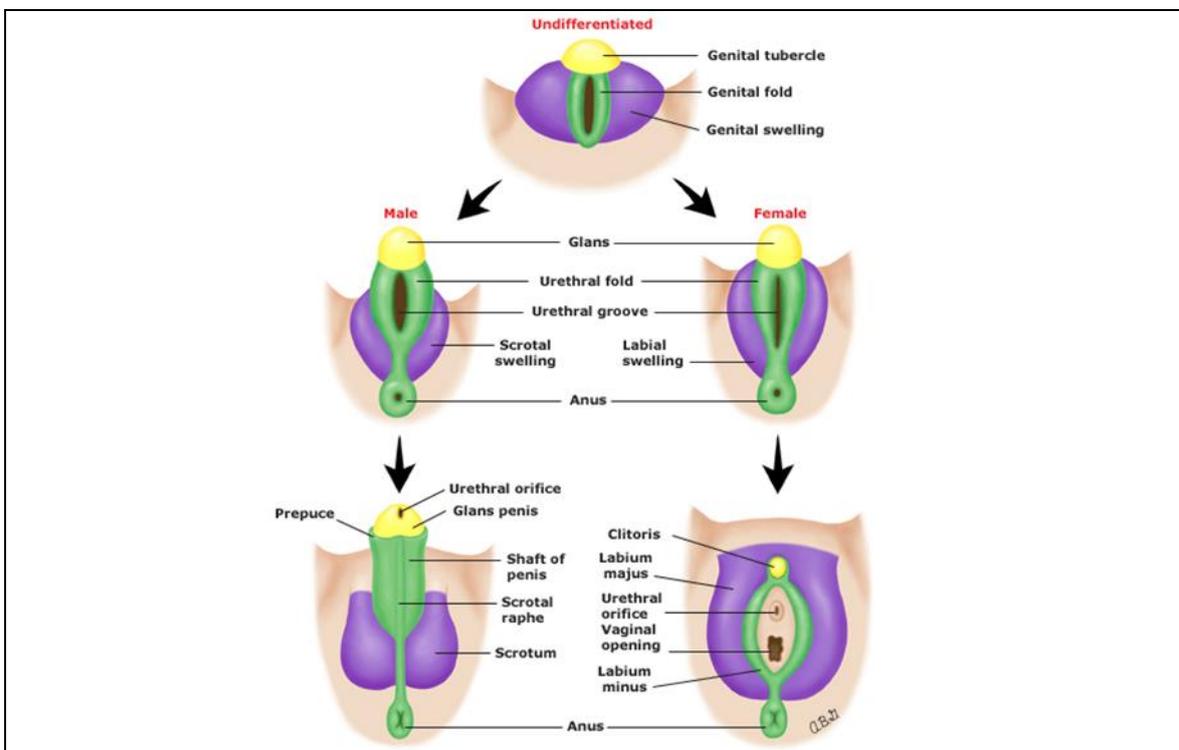


Abb. 2: Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane
(Verwendung mit Erlaubnis von UpToDate® [135])

1.2. Molekulare Mechanismen in der Geschlechtsentwicklung im besonderen Hinblick auf die Rolle von SF-1

Die verschiedenen Schritte der Geschlechtsdeterminierung werden durch unterschiedliche Faktoren reguliert. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei der Transkriptionsfaktor Steroidogenic Factor-1 (SF-1) ein. Dieser steuert eine Vielzahl von Differenzierungsschritten, wobei die korrekte Interaktion mit anderen Faktoren für eine regelrechte Entwicklung entscheidend ist (Abb. 3).

Die Expression von SF-1 beginnt ab dem 32. Tag nach der Ovulation (*day past ovulation*, d.p.o.) in der Genitalleiste und unterscheidet sich, entsprechend der auch zunächst indifferenten Gonadenanlage, bis zum 41. d.p.o. nicht zwischen den Geschlechtern [38]. SF-1 initiiert zunächst in beiden Geschlechtern die Transkription des *SOX9* (*Sry-related HMG Box-9*)-Gens. In einem *SRY*-exprimierenden Embryo werden so die Zellen für *SRY* sensibilisiert. *SRY* bindet dann zusammen mit SF-1 an verschiedene gonadenspezifische Enhancer von *SOX9*, wodurch dessen Transkription verstärkt wird. *SOX-9* kann schließlich gemeinsam mit SF-1 an seinen eigenen Promotor binden und im Rahmen einer autoregulatorischen Schleife die Konzentration im Verlauf aufrechterhalten [39,87,91]. *SOX-9* bewirkt schließlich die Entwicklung der Sertoli-Zellen aus ihren Vorläuferzellen [72,90].

Nach der Differenzierung der bipotenten Gonade in Richtung Hoden kann SF-1 hier ab dem 44. d.p.o. zunächst diffus nachgewiesen werden. Ab Tag 52 p.o. wird SF-1 dann am stärksten in den Keimsträngen exprimiert [38], welche die Sertoli-Zellen enthalten, und ist hier unter anderem an der Produktion von AMH beteiligt. Über verschiedene Bindungssequenzen innerhalb des *AMH*-Promotors kann SF-1 die Transkription stimulieren, wobei die Aktivität wiederum durch andere Transkriptionsfaktoren moduliert wird [93,124]. Eine direkte Protein-Protein-Interaktion findet beispielsweise zwischen SF-1 und *SOX-9*, *GATA4* sowie *WT-1* statt [24,74,113]. Die vollständige Aktivierung des *AMH*-Promotors kann nur in Anwesenheit aller Kofaktoren erreicht werden [69].

Zudem stimuliert SF-1 in den Sertoli-Zellen die Expression von Inhibin B, einem Hormon zur Regulation der FSH-Freisetzung. Durch die Interaktion von SF-1 mit *WT-1* kann hier ebenfalls ein additiver Effekt auf die Transkriptionsaktivierung erzielt werden [45,49].

Schließlich wird in den Sertoli-Zellen auch das Desert hedgehog (DHH)-Protein exprimiert, welches wiederum an der Differenzierung der Leydig-Zellen beteiligt ist [13]. In diesen interstitiellen Zellen kommt SF-1 hauptsächlich in der Fetalzeit vor [38] und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Steroidhormonbiosynthese. SF-1 aktiviert unter anderem verschiedene Cytochrom P450-Monooxygenasen [73], aber auch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, die ebenfalls an der Steroidbiosynthese beteiligt ist [57].

Zudem stimuliert SF-1 die Transkription des *Steroidogenic acute regulatory protein* (*STAR*)-Gens, welches indirekt eine Rolle für die Steroidhormonbiosynthese spielt. Das StAR-Protein reguliert den Cholesterin-Transport von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran, wo der erste Schritt der Steroidhormonbiosynthese durch die Cholesterin-Monooxygenase katalysiert wird (Überblick bei [100]). Über vier verschiedene Bindungselemente im *STAR*-Promotor kann SF-1 dessen Transkription steuern [70,101], wobei die Aktivität durch Kooperation von SF-1 beispielsweise mit dem Specificity protein 1 (SP1) gesteigert werden kann [102].

Der Insulin-like Faktor 3 (INSL3) wird ebenfalls in den Leydig-Zellen produziert, wobei auch hier die Transkription durch SF-1 aktiviert wird. INSL3 ist für die intraabdominale Phase des Hodendeszensus von Bedeutung [133].

In einem Embryo mit einem 46,XX-Karyotyp wird die Expression von SOX-9 durch die Ovarien-spezifischen Faktoren WNT4 und RSPO1, die über den β -Catenin-Signalweg wirken, sowie durch FOXL2 unterdrückt und so die Entwicklung hin zu weiblichen Gonaden induziert [89,116]. SF-1 wird sowohl in den Theka- als auch den Granulosazellen exprimiert und stimuliert auch hier die Steroidhormonbiosynthese [108]. Die Expression von *AMH* wird in einem 46,XX-Embryo zum einen direkt über WT-1 gehemmt [97], zum anderen stört DAX-1 die Interaktion von SF-1 und WT-1 am *AMH*-Promotor und verhindert so die Transkription [74]. *AMH* wird daher nicht gebildet und die Müller-Gänge können sich ausbilden.

Auch indirekt ist SF-1 über Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse an der Geschlechtsentwicklung beteiligt. SF-1 wird unter anderem im ventromedialen Hypothalamus und in den gonatotropen Zellen der Hypophyse exprimiert [5,43,98]. Hier aktiviert SF-1 beispielsweise die Expression des luteinisierenden Hormons (LH), des follikelstimulierenden Hormons (FSH), der α -Untereinheit der Glykoproteinhormone und des Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Rezeptors [43].

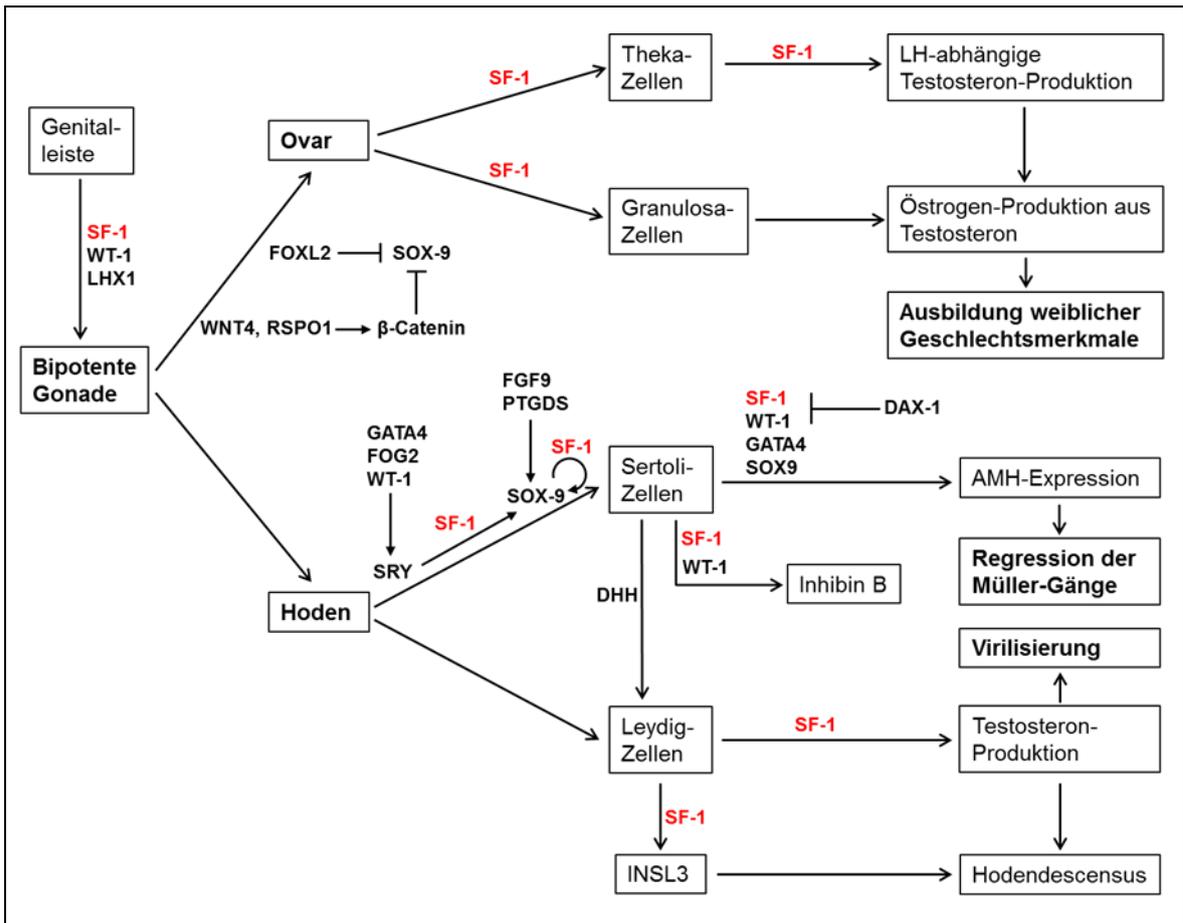


Abb. 3: Schema der Angriffspunkte von SF-1 und anderen Transkriptionsfaktoren in der Geschlechtsentwicklung

(modifiziert nach [9,68])

DAX-1 = Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1; DHH = Desert Hedgehog; FGF9 = Fibroblast Growth Factor 9; FOG2 = Friend of GATA 2; FOXL2: Forkhead Box L2; GATA4 = GATA binding protein 4; INSL3 = Insulin-like Factor 3; LHX1 = LIM Homebox Protein 1; PTGDS = Prostaglandin D2 Synthase; RSPO1 = R-Spondin 1; SF-1 = Steroidogenic Factor-1; SOX-9 = Sry-related HMG Box-9; SRY = Sex-determining Region of the Y chromosome; WNT4 = Wnt Family Member 4; WT-1 = Wilms-Tumor-Protein

→ = Aktivierung; —| = Hemmung

1.3. Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung – *Differences of sex development (DSD)*

Kommt es zu Veränderungen in einem der an der Geschlechtsdeterminierung beteiligten Gene, ist eine Abweichung von der regelrechten Entwicklung möglich, die sich in einer Diskrepanz zwischen dem chromosomalen, dem gonadalen und dem phänotypischen Geschlecht äußern kann. Für die verschiedenen Formen der klinischen Präsentation wird inzwischen die übergeordnete Bezeichnung ‚*Disorders of sex development*‘ (DSD) verwendet. Aufgrund der negativen Konnotation des Begriffs ‚*disorders*‘ (Störungen) wird dieser, entsprechend der Empfehlungen des Deutschen Ethikrates, in der vorliegenden Arbeit durch die Begriffe ‚*differences*‘ oder ‚Besonderheiten‘ ersetzt. Ältere Bezeichnungen wie ‚Intersexualität‘ oder ‚Hermaphroditismus‘ werden von Betroffenen teilweise als diskriminierend empfunden und sollten daher nicht mehr gebraucht werden [136].

Jährlich werden in Deutschland etwa 160 Kinder mit Besonderheiten der Geschlechtsentwicklung geboren [112]. Ist eine genaue Geschlechtszuordnung aufgrund eines ambivalenten Genitale bei einem neugeborenen Kind nicht möglich, kann seit dem Jahr 2013 die Angabe des Geschlechtes eines Kindes im Geburtenregister zunächst offengelassen werden [137]. Die Eintragung eines dritten Geschlechtes wie ‚inter‘ oder ‚divers‘ lehnte der Bundesgerichtshof jedoch in einem kürzlich gefassten Beschluss weiterhin ab [138].

Auch aufgrund der geringen Fallzahlen stellt das Behandlungsmanagement immer noch eine große Herausforderung dar. Eine definitive Diagnose kann im Kindesalter selbst nach ausführlicher Diagnostik nur bei ungefähr der Hälfte der Betroffenen gestellt werden [112]. Besonders in der Gruppe der vermindert virilisierten Patienten mit einem 46,XY-Karyotyp ist die Diagnosestellung aufgrund der ähnlichen Phänotypen oft schwierig [10]. Auf der Grundlage neuerer Erkenntnisse hinsichtlich genetischer Ursachen von DSD, aber auch aufgrund eines weiterentwickelten ethischen Verständnisses wurde im Jahr 2006 eine neue Klassifikation der Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung definiert (Tab.1), um so eine einheitliche Nomenklatur einzuführen und die Diagnosestellung sowie die Behandlung zu erleichtern [56].

Die größte Gruppe stellen dabei die Patienten mit einer unzureichenden Virilisierung bei einem 46,XY-Karyotyp dar (46,XY DSD), wobei wiederum eine Unterteilung in weitere Kategorien erfolgt. Die erste Kategorie umfasst Störungen der Androgensynthese oder –wirkung, die ursächlich für die verminderte Androgenisierung sind, wie beispielsweise der 5 α -Reduktase-Typ-II-Defekt und die Androgenresistenz. Diese wird in die komplette Androgenresistenz (CAIS) mit weiblichem äußerem Genitale und die partielle Androgenresistenz (PAIS) mit einem variablen Defizit der Virilisierung eingeteilt. Ursache ist hier ein

Defekt des Androgenrezeptors, wodurch Testosteron seine Wirkung nicht entfalten kann. Die Gonadenfunktion ist jedoch regelrecht, sodass ausreichend AMH zur Regression der Müller-Gänge gebildet wird.

Im Gegensatz dazu ist die zweite Kategorie von 46,XY DSD über eine Störung der Hodenentwicklung definiert. Dazu zählt unter anderem die Gonadendysgenese, die durch Mutationen in wichtigen Genen der Gonadenentwicklung verursacht wird. Je nach Ausprägung erfolgt eine Unterteilung in die komplette Gonadendysgenese mit vollständig weiblichem äußerem und innerem Genitale und die partielle Gonadendysgenese, bei der es zu einer variablen Ausprägung des Phänotyps kommt. Da in den meisten Fällen auch die Sertoli-Zellen von der Entwicklungsstörung betroffen sind, kommt es oft zu einer Persistenz der Müller-Gänge.

Von der Gruppe 46,XY DSD wird die Gruppe 46,XX DSD unterschieden. Diese beinhaltet alle Besonderheiten der Geschlechtsdeterminierung, die bei Betroffenen mit einem 46,XX-Karyotyp und einer vermehrten Virilisierung auftreten. Die häufigste Form von 46,XX DSD ist der 21-Hydroxylase-Mangel, der die Hauptursache des adrenogenitalen Syndroms darstellt.

Die letzte DSD-Gruppe umfasst numerische Aberrationen der Geschlechtschromosomen. Neben den bekannten syndromalen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Klinefelter- oder dem Ullrich-Turner-Syndrom, wird die gemischte Gonadendysgenese dazu gezählt [56].

46,XY DSD	46,XX DSD	DSD mit Aberrationen der Geschlechtschromosomen
1.) Störungen der Androgensynthese oder –wirkung a) Synthesestörungen (z.B. 5 α -Reduktase-Typ-II-Defekt, <i>STAR</i> -Mutationen) b) Störungen der Wirkung (z.B. CAIS, PAIS) c) Störungen von AMH/ des AMH-Rezeptors	1.) Androgenexzess a) fetal (z.B. 21- oder 11-Hydroxylase-Defekt) b) fetoplazentär (z.B. Aromatasemangel, P450-Oxidoreduktase-Mangel) c) maternal (z.B. Luteom, exogen)	1.) 45,X (Ullrich-Turner-Syndrom und Varianten)
		2.) 47,XXY (Klinefelter-Syndrom und Varianten)
2.) Störungen der testikulären Entwicklung a) Komplette Gonadendysgenese b) Partielle Gonadendysgenese c) Gonadale Regression d) Ovotestikuläre DSD	2.) Störungen der ovariellen Entwicklung a) Ovotestikuläre DSD b) Testikuläre DSD c) Gonadendysgenese	3.) 45,X/46,XY (gemischte Gonadendysgenese, ovotestikuläre DSD)
		4.) 46,XX/46,XY (Chimerismus, ovotestikuläre DSD)
3.) Andere (z.B. schwere Hypospadie, kloakale Ekstrophie)	3.) Andere (z.B. kloakale Ekstrophie, Vaginalatresie)	

Tab. 1: DSD-Klassifikation

(nach [56])

1.4. *NR5A1*-Mutationen als Ursache von Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung

Wie die zentrale Rolle von SF-1 in der Regulation der Geschlechtsdeterminierung vermuten lässt, können Mutationen im *NR5A1*-Gen zu verschiedenen DSD-Varianten führen. In den letzten Jahren konnten immer mehr Mutationen identifiziert werden, wobei das phänotypische Spektrum breit ist. Besonders in der Gruppe 46,XY DSD stellen *NR5A1*-Mutationen mit einer Frequenz zwischen 8 % [15] und 18,5% [51] eine relativ häufige Ursache dar.

Erstmals wurde im Jahr 1999 eine *NR5A1*-Mutation identifiziert. Die Mutation p.G35E fand sich bei einem Patienten mit weiblichen externen Genitalien, regelrechten Müller-Strukturen und nur schwach differenzierten Stranggonaden. Zudem lag eine primäre Nebennierenrindeninsuffizienz vor. Der Patient war heterozygot für die *de novo*-Mutation und wies einen 46,XY-Karyotyp auf [1]. Bei einem weiteren 46,XY-Patienten mit ähnlichem Phänotyp konnte die zweite *NR5A1*-Mutation (p.R92Q) nachgewiesen werden, welche homozygot vorlag. Die konsanguinen Eltern und die Schwester des Patienten waren heterozygot für die Mutation, zeigten aber keine phänotypischen Auffälligkeiten [2]. Die dritte beschriebene *NR5A1*-Mutation (p.R255L), die ebenfalls zur Nebennierenrindeninsuffizienz führte, wurde bei einer dafür heterozygoten Patientin mit 46,XX-Karyotyp und normalen weiblichen inneren sowie äußeren Genitalien gefunden. Soweit zum Zeitpunkt der Untersuchungen beurteilbar, war die Gonadenentwicklung nicht beeinträchtigt. Allerdings fiel sie nach der Geburt mit Zeichen einer Nebennierenrindeninsuffizienz auf; es konnten keine Nebennieren bei ihr detektiert werden [12].

Obwohl die ersten beschriebenen *NR5A1*-Mutationen bei Patientinnen und Patienten¹ mit einer Nebennierenrindeninsuffizienz vorkamen, wurden im weiteren Verlauf *NR5A1*-Mutationen nur noch bei Betroffenen mit bis zum Untersuchungszeitpunkt weitestgehend intakter Nebennierenrindenfunktion detektiert. Allerdings wurden bei drei Kindern eine leicht erhöhte ACTH-Konzentration und ein subnormaler Cortisol-Anstieg nach ACTH-Stimulation festgestellt, was auf eine minimal eingeschränkte Nebennierenrindenfunktion hindeuten kann [11,30].

Diese *NR5A1*-Mutationen betreffen Patientinnen und Patienten mit einem sehr breiten phänotypischen Spektrum an genitalen Varianten, wobei die Ausprägung sogar innerhalb einer Familie stark variieren kann. Die gravierendste Form des Virilisierungsdefizits ist das komplett weibliche Genitale bei einem 46,XY-Karyotyp. Diese Kinder wachsen meistens als Mädchen auf und fallen oft mit einem ausbleibenden Beginn der Pubertät oder mit Zeichen der Virilisierung im Laufe der Pubertät auf [11,15,51,62,64,78,83,99,123]. *NR5A1*-Mutationen wurden zudem bei 46,XY-Patienten mit einem variablen Androgenisierungsdefizit nachgewiesen, die beispielsweise bei Geburt eine Hypertrophie der Klitoris bzw. eine Verkürzung des Penis aufweisen. In diesen Fällen kommt es oft zu Schwierigkeiten der Geschlechtszuweisung, die zum Teil im weiteren Verlauf wieder geändert werden musste [3,15,18,21,22,40,51,62,64,67,78,81,106,110,121,123]. Eine mildere Form der verminderten Androgenisierung stellt die Hypospadie dar, die bei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen ebenfalls in verschiedenen Ausprägungen vorkommen kann [3,18,52,62,67,80,110,111,121,123,130]. Bei vielen dieser Patienten waren Gonaden

¹ Die Bezeichnungen ‚Patientin‘ und ‚Patient‘ werden in der vorliegenden Arbeit entsprechend des zugeordneten Geschlechts und unabhängig vom Karyotyp verwendet.

abdominal, inguinal oder skrotal vorhanden. Dabei variiert die Gonadenhistologie zwischen einer intakten Hodenstruktur und schwer dygenetischen Gonaden. Auch die Hormonwerte sind sehr variabel, wobei die Testosteron-Werte zumeist erniedrigt und die Konzentrationen der Gonadotropine erhöht sind. Es wurden jedoch auch normale Testosteronspiegel gemessen, die sogar zu einem Eintritt in die Pubertät führen konnten [18,30,80,110,123]. Passend zu einer Dysfunktion der Sertoli-Zellen waren AMH und Inhibin B oft erniedrigt. Überraschenderweise waren trotzdem zum Teil keine Müller-Strukturen vorhanden, sodass zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Entwicklung genug AMH vorhanden gewesen sein musste [22,52,62,81]. Auf dieses Phänomen wird in der Diskussion näher eingegangen.

NR5A1-Mutationen können allerdings auch zu Phänotypen außerhalb der Gruppe 46,XY DSD führen. Dazu gehört die Infertilität bei männlichen Patienten als leichteste Ausprägung. Die Männer zeigen eine normale Entwicklung und keine Auffälligkeiten der äußeren Genitalien. Dabei treten *NR5A1*-Mutationen mit einer Frequenz von 1,6 – 4% auf, wobei ethnische Unterschiede bestehen [9,84].

Auch bei 46,XX-Patientinnen kann die Gonadenfunktion durch *NR5A1*-Mutationen beeinträchtigt werden. Im Gegensatz zu der zuvor erwähnten Patientin mit Nebennierenrindeninsuffizienz, aber intakter ovarieller Funktion, wurden einige Patientinnen mit zunächst normaler Entwicklung, aber schließlich primärer Ovarialinsuffizienz (POI) beschrieben. Diese zeigte sich entweder als primäre bzw. sekundäre Amenorrhoe oder als prämatüre Menopause [15,18,64,123].

Kürzlich wurde das phänotypische Spektrum bei Betroffenen mit einem 46,XX-Karyotyp und einer *NR5A1*-Mutation erweitert. Die Mutation c.274C>T (p.Arg92Trp) wurde bei verschiedenen Patientinnen und Patienten mit (ovo)testikulärer DSD identifiziert. Dies bestätigt die Bedeutung von SF-1 auch bei der ovariellen Entwicklung, allerdings sind die genauen Details, wie Mutationen im *NR5A1*-Gen zur ovotestikulären DSD führen, bislang ungeklärt [7,8,42].

1.5. Struktur und Regulation der Aktivität von SF-1

Das *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (NR5A1)*-Gen, in dem die beschriebenen Mutationen identifiziert werden konnten und welches für SF-1 kodiert, liegt auf dem langen Arm von Chromosom 9 (9q33). Es enthält 7 Exons, wobei das erste Exon nicht kodierend ist [76]. Die Mutationen betreffen sämtliche Bereiche des Transkriptionsfaktors. Eine genaue Kenntnis über die Struktur von SF-1 ist für eine differenzierte

Analyse der durch die Mutationen entstandenen unterschiedlichen Einschränkungen der Funktion von SF-1 essentiell.

Das erstmals in den frühen 1990er Jahren identifizierte SF-1-Protein umfasst 461 Aminosäuren und ist 53 kDa groß [76,109]. Der Aufbau des Proteins entspricht der Struktur anderer nukleärer Rezeptoren (Abb. 4). Zwei N-terminale Zinkfinger vermitteln die DNA-Bindung, wobei der erste Zinkfinger die P-Box enthält [117], die mit der großen Furche der DNA über Erkennung des 5'-AGGPyCPu-3'-Motivs (Py=Pyrimidin, Pu=Purin) interagiert [65,115]. Dieses Motiv ist allen SF-1-Zielgenen gemeinsam. Angrenzend an den zweiten Zinkfinger befindet sich die akzessorische DNA-Bindungsregion mit der A-Box, die in der kleinen Furche der DNA bindet und so die Interaktion stabilisiert. Im Gegensatz zu anderen nukleären Rezeptoren bindet SF-1 nicht als Dimer, sondern als Monomer an die DNA [44,115]. Zudem trägt die A-Box zur Translokation in den Zellkern und zur Interaktion mit Kofaktoren bei [59].

Angrenzend an die A-Box befindet sich die Hinge-Region, welche die Aktivierungsdomäne-1 (AF-1) enthält. Diese erstreckt sich bis in die erste Helix der Ligandenbindungsdomäne (LBD) und unterstützt durch Assoziation mit den weiteren elf Helices der LBD die aktive Konformation von SF-1. Durch Phosphorylierung von Serin-203 in der AF-1 resultiert eine verstärkte Transaktivierungsaktivität von SF-1 sowie eine vermehrte Rekrutierung von Kofaktoren [23,26,37,58]. Weitere posttranslationale Modifikationen, die in der Hinge-Region stattfinden, sind zum einen die Acetylierung und die Ubiquitinierung zur Aktivitätssteigerung von SF-1 [48,66,120]. Zum anderen kann das Protein sumoyliert werden, wobei ein SUMO (*small ubiquitin like modifier*) über eine kovalente Bindung an einen Lysinrest angehängt und so die Aktivität von SF-1 reduziert wird [55].

Die Ligandenbindungsdomäne erstreckt sich über 12 α -Helices. Am distalen Ende befindet sich die Aktivierungsdomäne 2 (AF-2). Über Interaktion mit verschiedenen Kofaktoren ist die AF-2 wichtig für die vollständige Transkriptionsaktivität von SF-1 [46,47].

Bei der Erstbeschreibung von SF-1 konnten keine Liganden identifiziert werden, sodass er lange als ‚*orphan receptor*‘, also als ein ‚verwaister nukleärer Rezeptor‘ galt. Fast zehn Jahre später wurden Phospholipide als endogene Liganden beschrieben, die für eine vollständige Aktivität von SF-1 essentiell sind [53]. Die Phospholipide binden in einer relativ großen Tasche der LBD, wodurch diese ihre aktive Konformation erhält und SF-1-Koaktivator-Interaktionen möglich werden [60]. Als weitere Liganden von SF-1 stellten sich Sphingolipide wie Sphingosin und Lyso-Sphingomyelin heraus, die zu einer Abschwächung der Transaktivierungsaktivität von SF-1 führen [118].

Neben der posttranslationalen Modifikation und der Interaktion mit verschiedenen

Kofaktoren kann auch die Transkription des Gens selbst reguliert werden. Es wurden verschiedene gewebespezifische Enhancer in der Nebenniere, dem ventromedialen Hypothalamus, der Hypophyse und den Leydig-Zellen beschrieben [94–96,134]. An diese Enhancer und andere spezifische Bindungsstellen im *NR5A1*-Promotor können Faktoren wie beispielsweise SP1 [88], GATA4 [114], SOX-9 [92], FOXL2 [107] und WT-1 [129] binden.

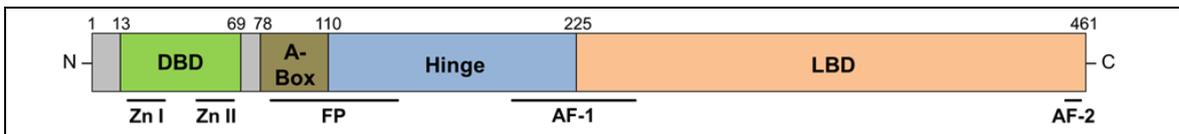


Abb. 4: Struktur des SF-1-Proteins

Die Zahlen geben die Nummern der Aminosäuren an. DBD = DNA-Bindungsdomäne, LBD = Ligandenbindungsdomäne, Zn I und II = Zinkfinger, AF-1 und -2 = Aktivierungsdomäne-1 und -2 (nach [15,22,119])

1.6. Fragestellung

Wie diese Darstellung deutlich macht, können *NR5A1*-Mutationen in ganz unterschiedlichen Phänotypen resultieren. Dabei konnte bisher trotz genauer struktureller Kenntnis von SF-1 noch keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation definiert werden. Durch die zusätzliche Überschneidung der klinischen Präsentation mit anderen Ursachen für Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung wird die Diagnosestellung erschwert und erfolgt oft verzögert. Dies kann zum einen die Behandlung beeinträchtigen und zum anderen für einige Betroffene eine große psychische Belastung darstellen [14]. Ein besseres Verständnis der Pathogenese der Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung wäre daher wünschenswert, um so möglicherweise die Betreuung von Patienten und Patientinnen mit DSD verbessern zu können.

Die von Herrn Prof. Dr. med. Olaf Hiort geleitete Arbeitsgruppe, in der die vorgelegte Dissertation angefertigt wurde, hat Patientinnen und Patienten mit DSD aufgrund ihres klinischen Erscheinungsbildes zunächst unter anderem hinsichtlich der Mutationen in den Genen des Androgenrezeptors (*AR*-Gen), der 5 α -Reduktase (*SRD5A2*-Gen) oder der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (*HSD17B3*-Gen) untersucht. Wenn sich dabei keine Auffälligkeiten ergaben, wurde zusätzlich eine Analyse des *NR5A1*-Gens durchgeführt. Dies erfolgte bei einem Teil der Betroffenen einige Jahre nach der ersten ärztlichen Vorstellung, sodass auch bei diesen Patienten über eine gewisse Zeit keine definitive Diagnose gestellt werden konnte. Bei der Sequenzierung des *NR5A1*-Gens konnten fünf bisher nicht beschriebene heterozygote Mutationen identifiziert werden, wobei sich zwei Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne befinden, zwei Mutationen in der Hingeregion lokalisiert sind und eine Mutation in der Ligandenbindungsdomäne liegt. Die klinische Präsentation variierte auch in dieser Patientengruppe stark und wird im nächsten Abschnitt genauer dargestellt.

Nicht jede Veränderung der DNA-Sequenz führt zu einer Einschränkung der Funktionalität von SF-1. Es kann sich auch um einen Polymorphismus oder um eine Mutation ohne Beeinträchtigung der Transaktivierungsaktivität handeln. Ziel dieser Arbeit war es daher, die fünf neuen Mutationen bezüglich ihrer Funktionalität zu charakterisieren, um so eine Aussage über ihre Bedeutung bei der Krankheitsentstehung treffen zu können. Dazu sollten die einzelnen Mutationen zunächst hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Transaktivierungsaktivität von SF-1 untersucht werden, welche zur genaueren Darstellung der Funktionalität an unterschiedlichen Promotoren getestet werden sollte. Als Erklärung einer eventuell reduzierten Transaktivierungsaktivität sollte die Proteintranslation und -stabilität der verschiedenen SF-1-Mutanten mittels Western Blots analysiert werden und

im Rahmen von DNA-Bindungsanalysen die Auswirkungen der Mutationen auf die DNA-Bindungskapazität von SF-1 untersucht werden. Zudem sollte anhand von Kern- und Zytoplasmaextrakten die Frage beantwortet werden, ob die Mutationen auch die Translokation des nukleären Rezeptors SF-1 in den Zellkern beeinträchtigen.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollten die Mutationen zunächst in ihrer strukturellen Auswirkung auf das SF-1-Protein analysiert werden, um so möglicherweise eine Verbindung zwischen der Mutation und dem jeweiligen Phänotyp herstellen zu können. Zudem sollte anhand dieser Erkenntnisse und durch den Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen die Bedeutung von *NR5A1*-Mutationen auf die Geschlechtsentwicklung diskutiert werden, wodurch ein möglicher Erklärungsansatz unter anderem für die große phänotypische Variabilität bei Mutationen im *NR5A1*-Gen gefunden werden sollte. Dies könnte die Grundlage für die Definition einer klareren Genotyp-Phänotyp-Korrelation sowie für eine mögliche Überarbeitung der bestehenden DSD-Klassifikation darstellen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Patientinnen und Patienten

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hiort wurden im Rahmen der Dissertation von Ralf Lünstedt die Exons 1-7 des *NR5A1*-Gens von 27 Patientinnen und Patienten mit DSD sequenziert (bewilligt durch das Ethikvotum AZ: 08-081). Dazu wurden das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit und der ABI 3130 Genetic Analyzer (beides Applied Biosystems, USA) verwendet. Es konnten fünf bisher nicht beschriebene Mutationen im *NR5A1*-Gen identifiziert werden (Abb. 5). Die genauen Hormonwerte sind im Anhang dargestellt.

Patientin 1 zeigte bei ihrer Geburt einen Mikropenis mit einer Länge von 13 mm und partiell fusionierte Labioskrotalfalten. Der Karyotyp war 46,XY. Sowohl in der Sonographie als auch in der Laparoskopie konnten keine Müller-Strukturen nachgewiesen werden; ebenso zeigte sich beidseits kein Nebenhoden oder Ductus deferens. In beiden Leistenkanälen konnten hodenähnliche Strukturen nachgewiesen werden, wobei die Biopsie Hodengewebe mit tubulären Strukturen und Sertoli-Zellen ohne Leydig-Zellen oder Hinweise auf Malignität ergab. Die basalen Werte von Androstendion, Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) waren erniedrigt und auch nach Stimulation mit humanem Choriongonadotropin (hCG) kam es nicht zu einem regelrechten Anstieg. Die Gonadotropine waren ebenfalls niedrig. Mutationen in den Genen *WT1*, *LHCGR*, *CYP17A1*, *HSD17B3*, *SRD5A2* und *AR* konnten ausgeschlossen werden. Die Patientin wuchs als Mädchen auf.

Bei ihr konnte im *NR5A1*-Gen die Mutation c.51_65del (Exon 2) nachgewiesen werden. Diese stellt eine Deletion von 15 Nukleotiden dar und führt damit zu einem Verlust von fünf Aminosäuren im Protein (p.D18_G22del). Die Mutation liegt im ersten Zinkfinger der DNA-Bindungsdomäne.

Patient 2 fiel nach der Geburt mit einem ambivalenten Genitale mit einer verminderten Phalluslänge von 13 mm und prominenten Labioskrotalfalten auf, in denen beidseits Gonaden palpabel waren. Es konnte ein 46,XY-Karyotyp detektiert werden. In der Laparoskopie zeigten sich eine rudimentäre Vagina sowie hypoplastische Gonaden mit vorhandenen Nebenhoden. Müller-Strukturen waren nicht nachweisbar. Die Hodenbiopsie ergab normales frühkindliches Hodengewebe mit einer guten Keimzellausstattung. Die Testosteron-Werte im Neugeborenenalter waren leicht erniedrigt, die Werte von FSH und LH lagen im oberen Normbereich. ACTH wurde hochnormal gemessen, wobei die

Cortisol-Konzentration dementsprechend subnormal war. Der ACTH-Test ergab einen guten Anstieg von Cortisol.

Die Geschlechtszuordnung wurde im Verlauf von weiblich zu männlich geändert und geschlechtsangleichende Operationen durchgeführt. Im Alter von zehn Jahren lag das Tanner-Stadium G2 vor. Es konnten normwertige Testosteron-Konzentrationen sowohl basal als auch nach hCG-Stimulation nachgewiesen werden. Der Inhibin B-Wert war erniedrigt und mit elf Jahren nicht mehr detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt war FSH erhöht. Es wurde eine Testosterontherapie initiiert. Darunter kam es zu einer regelrechten Pubertätsentwicklung, die Tanner-Stadien wurden mit 15,8 Jahren als G 4, PH 6 beschrieben. Auch die Nebennierenrindenfunktion war normal.

Es wurden verschiedene molekulare Analysen durchgeführt. Mutationen im *AR*- oder *SRD5A2*-Gen konnten nicht nachgewiesen werden. Der Patient wies jedoch im *NR5A1*-Gen ebenfalls eine in der DNA-Bindungsdomäne liegende Mutation auf (c.118A>C, p.T40P). Diese Mutation befindet sich im Protein zwischen den beiden Zinkfingern.

Patientin 3 stellte sich im Alter von 13 Jahren mit einem ambivalenten Genitale vor; über den Phänotyp direkt nach der Geburt ist nichts bekannt. Die Sekundärbehaarung war ausgeprägt (Tanner-Stadium PH 4) und unter einer Hormonersatztherapie mit Östrogenen zeigte sich eine Brustentwicklung. Ein Uterus konnte sonographisch nicht identifiziert werden. Die Chromosomenanalyse ergab einen 46,XY-Karyotyp. Der Testosteronwert war erniedrigt, Androstendion und DHT lagen dagegen im Normbereich. Die Werte der Gonadotropine waren stark erhöht. Mittels Genanalysen konnte ein PAIS, ein 5 α -Reduktase- sowie ein 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-3-Mangel ausgeschlossen werden. Die Familienanamnese ergab eine penoskrotale Hypospadie bei dem Bruder der Patientin.

Bei dieser Patientin wurde die Punktmutation c.382del in Exon 4 des *NR5A1*-Gens identifiziert. Diese führt zu der *frameshift*-Mutation p.V128CfsX168, die einen vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese bedingt. Die Mutation liegt in der N-terminalen Hinge-Region nahe der A-Box.

Patient 4a fiel bei seiner Geburt mit einer skrotalen Hypospadie und einer Verkürzung des Penis auf 24 mm auf. Die Hoden waren beidseits in einem Scrotum bipartitum tastbar. Müller-Strukturen waren nicht vorhanden. Es wurde ein 46,XY-Karyotyp nachgewiesen. Im Verlauf wurden Operationen zur Korrektur der Fehlbildungen durchgeführt und das Kind wuchs im männlichen Geschlecht auf. Die Androgene, Gonadotropine und Inhibin B lagen im Normalbereich. Die Sequenzierung des *AR*-Gens zeigte eine polymorphe Verkürzung einer Polyglycin-Sequenz, die zu einer Reduktion der AR-Aktivität auf 60-65% führt und mit dem Auftreten einer Hypospadie und eines Mikropenis assoziiert ist [125].

Daher bestand zunächst der Verdacht auf ein PAIS.

Mit zwölf Jahren wies der Patient normwertige Gonadotropin- und Testosteronkonzentrationen auf, wobei Inhibin B vermindert war. Im Alter von 14,7 Jahren befand er sich im Tanner-Stadium G 4 und PH 4. Testosteron, ACTH, Cortisol und LH lagen im Normbereich. FSH war leicht erhöht und stieg mit 16 Jahren weiter an, wobei Inhibin B stark erniedrigt war. Eine Spermienanalyse lehnte der Patient ab.

Die Schwester (Patientin 4b) wurde im Alter von 15 Jahren mit einer primären Amenorrhoe, einem fehlenden Eintritt in die Pubertät (Tanner-Stadien PH 1, B 1) und einer prominenten Klitoris auffällig. Die Gonadotropine waren stark erhöht, Testosteron und Inhibin B lagen beide unterhalb der Nachweisgrenze. ACTH und Kortisol waren jeweils im Referenzbereich. Auch hier zeigte sich ein 46,XY-Karyotyp. In der Laparoskopie konnte ein kleiner Uterus sowie dysgenetische Gonaden nachgewiesen werden. Es wurde eine Gonadektomie durchgeführt, wobei die Histologie rudimentäres Hodengewebe mit Fibrose, einzelnen Ductuli und vermehrten Leydig-Zellen ergab. Gleichzeitig lagen intakte Nebenhoden und Anteile von Tuben vor. Es wurde eine Therapie mit Östradiol durchgeführt, worunter es zu einem Wachstum des Uterus sowie einer Brustentwicklung kam mit einem Tanner-Stadium B 4 im Alter von knapp 16 Jahren. Eine Menarche trat nicht auf. Die Gonadotropine waren weiterhin stark erhöht, Östradiol lag im niedrigen weiblichen Referenzbereich.

Bei der gesamten Familie wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Dabei konnte bei beiden Geschwistern sowie bei der Mutter im *NR5A1*-Gen die Mutation c.630_636del (p.Y211TfsX83) in Exon 4 nachgewiesen werden, die eine Deletion von sieben Nukleotiden bewirkt und damit ebenfalls zur Verschiebung des Leserahmens mit einer starken Verkürzung des Proteins führt. Auch diese Mutation liegt in der Hingeregion.

Der beschriebene Polymorphismus im *AR*-Gen wurde ebenfalls bei Patientin 4b und der Mutter identifiziert. Als weiteres mögliches Kandidatengen, das den Phänotyp beeinflussen könnte, wurde zudem bei Patientin 4b und ihrer Mutter eine heterozygote *missense*-Mutation im *T-box factor 2 (TBX2)*-Gen detektiert (c.641A>G; p.N214S). Dieses Gen ist beteiligt an der murinen Geschlechtsentwicklung [28].

Die Mutter zeigte bis zum Untersuchungszeitpunkt keine Zeichen einer vorzeitigen Menopause. Der Vater, bei dem keine Mutation im *NR5A1*-Gen nachgewiesen wurde, war ebenfalls phänotypisch unauffällig.

Die Patientin 5 stellte sich mit 14 Jahren aufgrund eines vermehrten Hirsutismus und einer primären Amenorrhoe vor. Bis zu diesem Zeitpunkt verlief die Entwicklung normal weiblich. Bei der Untersuchung fanden sich weiterhin eine Klitorishypertrophie, eine Lipomastie, Striae distensae, eine Acanthosis nigricans sowie eine Adipositas mit einem BMI von 31 kg/m². Im MRT zeigten sich ein Vaginalstumpf, eine kleine Prostata, eine Samenblasendrüse und beidseits Gonaden inguinal, aber keine Müller-Strukturen. Die Gonadenbiopsie zeigte ein Sertoli-cell-only-Syndrom. Der hCG-Test ergab eine gute Stimulierbarkeit von Testosteron, DHT und Androstendion. AMH und Inhibin B waren erniedrigt. Es fanden sich keine Auffälligkeiten im oralen Glucosetoleranztest oder in den Werten der Schilddrüsenhormone. Bei der Chromosomenanalyse stellte sich ein 46,XY-Karyotyp heraus. Durch Gensequenzierung konnten keine Mutationen im *AR*-, *SRD5A2*- und *HSD173B*-Gen oder im *LH/Gonadotropinrezeptor (LHCGR)*-Gen als Ursache nachgewiesen werden.

Da die Patientin sich mit dem weiblichen Geschlecht identifizierte, wurde eine Hormontherapie mit Östrogenen eingeleitet und eine Gonadektomie sowie eine Klitorisreduktion durchgeführt.

Bei dieser Patientin konnte im *NR5A1*-Gen die Punktmutation c.689T>G (p.L230R) detektiert werden, die in der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne liegt.

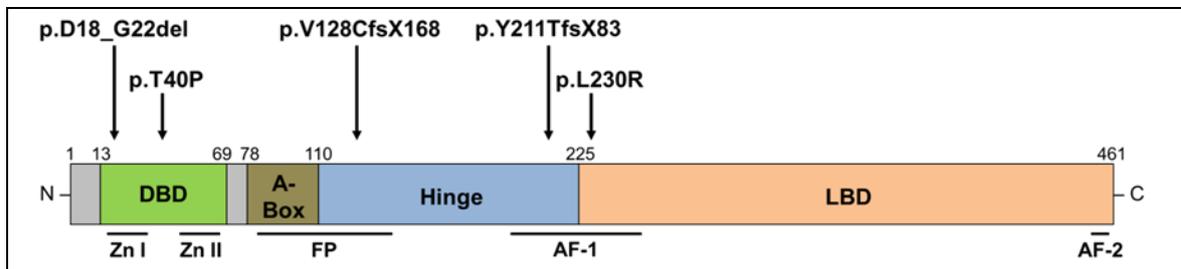


Abb. 5: Verteilung der neuen Mutationen im SF-1-Protein

2.2. Materialien

2.2.1. Bakterien- und HeLa-Zellen

Zur Klonierung wurden kompetente *Escherichia coli* DH5 α des Genotyps *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17* der Firma New England BioLabs (USA) eingesetzt.

Die verwendeten HeLa-Zellen stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). Es sind menschliche Epithelzellen, die ursprünglich im Jahr 1951 aus einem Adenokarzinom der Zervix der Patientin Henrietta Lacks isoliert wurden. Sie besitzen eine Verdopplungszeit von ca. 48 Stunden.

2.2.2. Plasmide

SF-1-Expressionsvektor pMyc-SF1

Der SF-1-Expressionsklon wurde freundlicherweise von Dr. Yukihiro Hasegawa (Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Zur Konstruktion des Expressionsvektors pMyc-SF1 wurde der Vektor pCMV-Myc von Clontech Laboratories Inc. (USA) verwendet. Mit Hilfe der Restriktionsenzyme *XhoI* und *NotI* wurde die cDNA von hSF-1 in die Multiple Cloning Site von pCMV-Myc eingefügt. Das SF-1-Startcodon wurde von ATG zu GTG geändert, sodass ein Myc-tag-SF-1-Fusionsprotein entsteht. Der Vektor besitzt unter anderem einen CMV-Promotor, über den das Gen stark exprimiert wird, ein Myc-Epitop und ein Ampicillin-Resistenzgen. Durch dieses kann eine Selektion der mit dem Vektor transfizierten Bakterien erfolgen. Das Myc-Epitop (N-QKLISEEDL-C) dient zur späteren Detektion von SF-1 mittels eines gegen das Myc-Epitop gerichteten Antikörpers.

Auf Basis des Wildtyp-Vektors wurden Plasmide mit den fünf zu untersuchenden Mutationen hergestellt. Zur Kontrolle wurde ein pCMV-Myc Leervektor konstruiert. Dazu wurde die SF-1-cDNA unter Verwendung der Restriktionsenzyme *XhoI* und *NotI* herausgeschnitten und anstelle der cDNA von SF-1 ein Oligo-Linker (Sense: 5'-TCGAGGTACCGC-3', Antisense: 5'-GGCCGCGGTACC-3') in den Vektor eingefügt.

Reportergene

Als Reportergene werden solche Gene bezeichnet, durch die die Expression eines anderen Gens quantifiziert werden kann. Das Reportergen wird hinter die Promotorregion des zu untersuchenden Gens eingebracht. Bei Aktivierung der Transkription wird das Reportergen ebenfalls exprimiert.

Die anschließende Detektion wird durch verschiedene Eigenschaften des Reportergens ermöglicht. In diesen Experimenten wurde eine *Firefly*-Luciferase als Reportergen verwendet. Das Gen stammt aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Die *Firefly*-Luciferase katalysiert in Anwesenheit von ATP und Sauerstoff die Oxidation des Substrats Luciferin zu Oxyluciferin (Abb. 9). Dieses ist instabil und zerfällt unter Abgabe eines Photons. Das emittierte Licht kann mittels eines Luminometers gemessen werden [35,127].

Als Transkriptionsfaktor beeinflusst SF-1 über die Bindung an die Promotoren des *AMH*- und *STAR*-Gens deren Transkription und somit auch die Expression der Luciferase in den von uns verwendeten AMH-Luc und STAR-Luc Konstrukten. Die abgegebene Lichtmenge ist proportional zur Transaktivierungskapazität von SF-1.

Das Reportergen AMH-Luc (Abb. 6) wurde freundlicherweise von Dr. Yukihiro Hasegawa zur Verfügung gestellt und enthält 357 bp des proximalen Promotors des humanen *Anti-Müller-Hormon*-Gens vor der Leuchtkäfer-Luciferase. SF-1 bindet als Transkriptionsfaktor an den *AMH*-Promotor und stimuliert die Expression. Der Promotorbereich enthält eine SOX-Bindungssequenz (5'-TCTTTGAGA-3'), zwei SF-1-responsive Elemente (5'-AGGACA-3' und 5'-CCAAGGTCG-3') sowie drei GATA-Motive [9,24].

Das Reportergen STAR-Luc (Abb. 6) enthält 518 bp des humanen *Steroidogenic acute regulatory (STAR)*-Promotors vor der Leuchtkäfer-Luciferase. Dieser Promotor weist drei Sequenzen zur SF-1-Bindung (SF-1-Site 1: 5'-TATCCTTGAC-3', SF-1-Site 2: 5'-CAGCCTTC-3', SF-1-Site 3: 5'-CCTTGA-3') sowie zwei Bindungselemente für den Transkriptionsfaktor Specificity protein 1 (SP1, 5'-CCCGCC-3') auf [101,102].

pSTAR-Luc wurde ebenfalls von Dr. Hasegawa (Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Basis beider Reportergenkonstrukte ist ein pGL4 Luciferase Reporter Vector (Promega, USA).

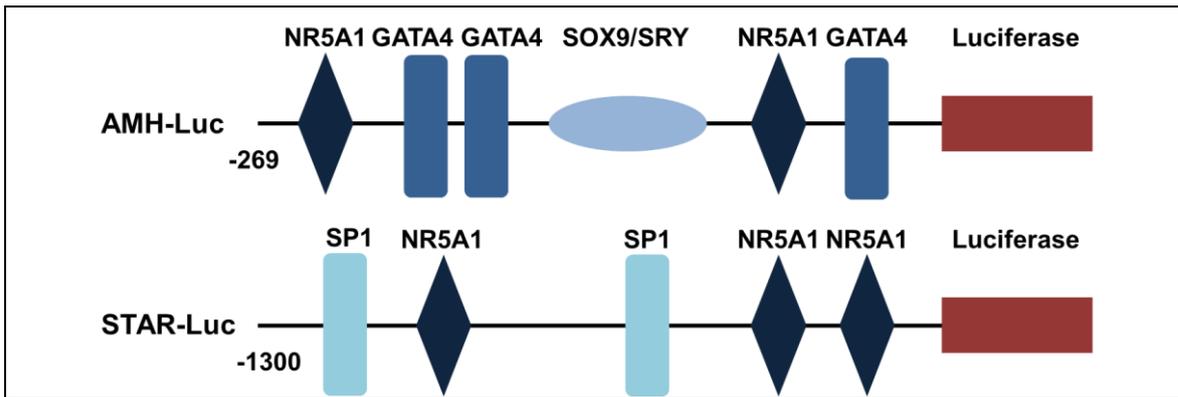


Abb. 6: Aufbau der Reporter Gene AMH-Luc und STAR-Luc

(nach [9,24,101,102])

Renilla-Luciferase

Der pGL4.74 [hRluc/TK]-Vektor (Promega, USA) codiert für das Luciferase-Reportergen *hRluc* (*Renilla reniformis*). Über den Herpes-Simplex-Virus-Thymidin-Kinase (HSV-TK)-Promotor wird diese Luciferase konstitutiv und somit unabhängig von der SF-1-Aktivität exprimiert. Bei der von der Renilla-Luciferase katalysierten Reaktion wird Coelenterazin zu Coelenteramid oxidiert, wobei Licht emittiert wird (Abb. 9). Durch Kotransfektion von pGL4.74 mit den SF-1-abhängigen Reporter Genen ist eine Normalisierung der Transfektionseffizienz möglich.

2.3. Methoden

2.3.1. Bakterienkultur

Anzucht der Bakterien auf Agarplatten

Transformierte *E. coli*-Bakterien wurden auf Agarplatten angezüchtet. Zur Herstellung der Platten wurden 10 Kapseln Bakterien-Medium (LB-Medium, MP Biomedicals, USA) und 6g Agar-Agar (Bacto™ Agar, BD, USA) in 400 ml Aqua bidest. bei 121°C autoklaviert. Zur Selektion der transfizierten Bakterien erfolgte nach dem Abkühlen des Mediums auf 60°C die Zugabe von Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml. Bakterien, die ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen haben, exprimieren eine Beta-Lactamase, sodass sie trotz des Antibiotikums wachsen können. Nach dem Gießen des

Mediums in die Petrischalen und Aushärtung des Agars wurden die Platten bei 4°C gelagert.

Bakterienflüssigmedium

Für die Flüssigkulturen wurden ebenfalls 10 Kapseln Bakterien-Medium in 400 ml Aqua bidest. bei 121°C autoklaviert und das Medium bei Raumtemperatur gelagert. Zur Kultivierung der Bakterien wurden je nach benötigter Bakterienmenge 10 ml bzw. 200 ml des Mediums mit Ampicillin (Konzentration 100 µg/ml) versetzt sowie mit den entsprechenden Zellen angeimpft und bei 37°C und 220 upm (Umdrehungen pro Minute) im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, USA) bebrütet.

Glyzerolstocks

Zur langfristigen Lagerung der transformierten Bakterien erfolgte die Herstellung von Glyzerolstocks. Dazu wurden die Bakterien über Nacht bei 37°C und 220 upm schüttelnd inkubiert. 900 µl der Zellsuspension wurden mit 900 µl 60%igem Glyzerol gemischt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Glyzerolstocks wurden bei -80°C gelagert.

2.3.2. Klonierung

Als Klonierung wird ein gentechnisches Verfahren bezeichnet, bei dem spezifische DNA in einen Vektor integriert wird. Diese Vektoren werden in Empfängerzellen eingeschleust, in welchen anschließend beispielsweise die in der DNA enthaltene Information exprimiert wird.

In dieser Arbeit wurden zunächst cDNA-Fragmente mit den verschiedenen zu untersuchenden Mutationen und den später verwendeten Restriktionsschnittstellen mittels Mutagenese-PCR hergestellt und in einen Klonierungs-Vektor (pJet2.1) eingebracht. Nach Transformation der Vektoren in kompetente *E. coli*-Bakterienzellen (DH5α) wurden die Plasmid-tragenden Zellen auf Ampicillin-haltigem Medium selektiv vermehrt und konnten anschließend isoliert werden.

Mutagenese-PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird zur Vervielfältigung kurzer, definierter DNA-Abschnitte *in vitro* eingesetzt. Diese Segmente werden mittels eines bestimmten Primer-Paares, einer hitzebeständigen Polymerase und Nukleosidtriphosphat-Molekülen exponentiell amplifiziert. Mit Hilfe eines Thermocyclers werden die entsprechenden

Temperaturen zur Denaturierung, zur Primer-Anlagerung und zur Elongation zyklisch generiert.

Zur Verringerung von Fehlern bei der DNA-Synthese wurde die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA) mit Korrekturlese-Funktion verwendet. Diese erkennt bei der DNA-Synthese selbstständig fehlerhaft eingebaute Nukleotide und kann diese durch ihre 3'-5'-Exonucleaseaktivität direkt entfernen. Die Mutagenese wurde im Mastercycler gradient (Eppendorf, Deutschland) durchgeführt. Als Matrize wurde der SF-1-Wildtyp-Vektor verwendet. Zunächst wurden je Mutation PCR 1 und 2 mit den Primerpaaren A/B und C/D durchgeführt, wobei je zwei Primer (Primer B und C) die entsprechenden Mutationen enthielten. Die beiden entstandenen Fragmente wurden anschließend in PCR 3 mit den Primern A und D amplifiziert. Das daraus resultierende DNA-Segment enthielt die jeweilige Mutation und Restriktionsschnittstellen (Abb. 7). Die entsprechenden Primer und Temperaturen sind im Anhang zu finden. Die PCR-Bedingungen wurden mittels des Programms oligo.exe 4.0 ermittelt.

Nach jeder Amplifikation wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel (2%, 2g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) aufgetrennt, das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt und die entsprechende Bande unter UV-Licht ausgeschnitten. Als Marker wurde die 100 bp DNA Ladder von New England BioLabs (USA) verwendet.

Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit von Roche (Schweiz) nach dem Protokoll des Herstellers ‚Purification of DNA Fragments from Agarose Gel‘. Die Konzentration der isolierten DNA wurde im BioPhotometer plus (Eppendorf, Deutschland) gemessen.

Die PCR-Produkte wurden in den linearisierten Vektor pJET1.2/blunt Cloning Vector mit Hilfe des CloneJET™ PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, USA) und der T4 DNA Ligase (New England BioLabs, USA) eingebracht. Nach Transformation der Vektoren in kompetente *E. coli*-Stämme wurde zur Überprüfung, in welchen Kolonien das richtige Fragment in den Vektor eingebaut wurde, am nächsten Tag eine Colony-PCR durchgeführt. Dazu wurden die Primer aus dem CloneJET PCR Cloning Kit und die AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, USA) verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel (1%) aufgetrennt. Danach erfolgten die Umklonierung der DNA mittels Minipräparation, der Restriktionsverdau und das Einbringen der Fragmente in den Expressionsvektor.

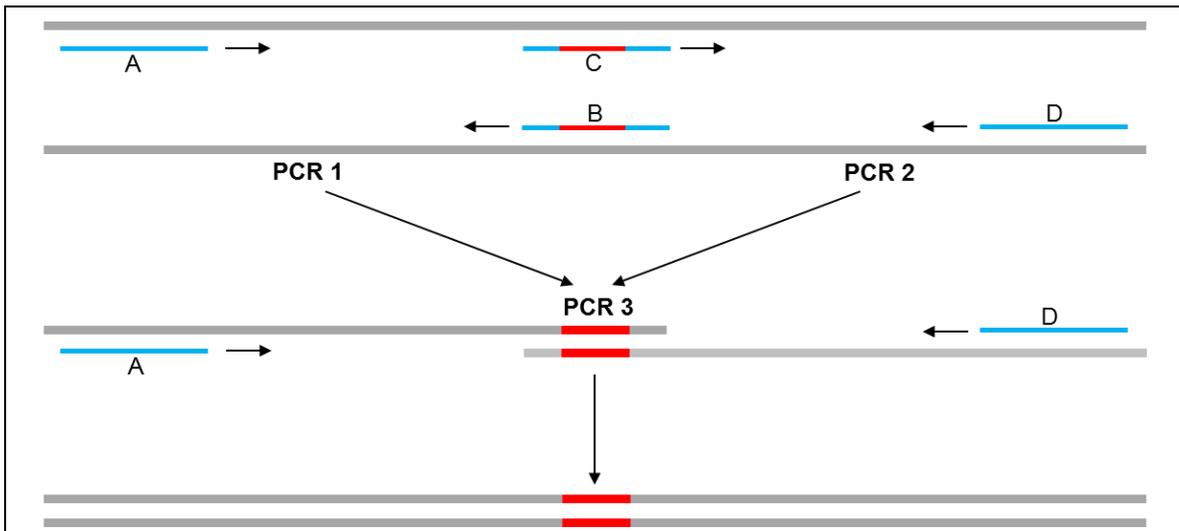


Abb. 7: Schema der Mutagenese-PCR

(grau: DNA-Matrize, blau: Primer, rot: Mutation)

Subklonierung

Bei der Subklonierung wird die Ziel-DNA, welche sich in den aus den Bakterienzellen extrahierten Plasmiden befindet, in einen Expressionsvektor eingebracht. Dazu wird zunächst ein Restriktionsverdau durchgeführt, bei dem die Plasmid-DNA in definierte Fragmente zerschnitten wird. Die Restriktionsenzyme erkennen bestimmte DNA-Sequenzen von 4-8 Nukleotiden und schneiden hier hochspezifisch. Als Schnittstellen wurden je Mutation zwei solcher Sequenzen verwendet, die jeweils nur einmal im Vektor vorkommen, sodass genau das Fragment herausgeschnitten wird, welches die Mutation trägt. Der Expressionsvektor pMyc-SF1 wurde entsprechend der Mutationen mit den gleichen Enzymen wie das in den pJET1.2/blunt Cloning Vector klonierte Fragment geschnitten (Abb. 8). Die verwendeten Restriktionsenzyme (New England BioLabs, USA) sind im Anhang aufgeführt.

Die Fragmente wurden mit Hilfe eines Agarosegels (1%) aufgetrennt. Es wurden jeweils der Expressionsvektor und das die Mutation tragende Fragment einzeln ausgeschnitten und aufgereinigt.

Ligation

Bei der Ligation wird ein spezifisches DNA-Segment mit einem geeigneten Vektor verknüpft und so ein rekombinantes Plasmid hergestellt (Abb. 8). Für diese Reaktion wurde die T4 DNA Ligase verwendet, welche 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen durch Phosphodiester-Bindungen verknüpft. Der Ligationsansatz von 20

µl wurde über Nacht bei 16°C im Thermocycler inkubiert. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle eine Religation des Vektors ohne cDNA-Fragment durchgeführt.

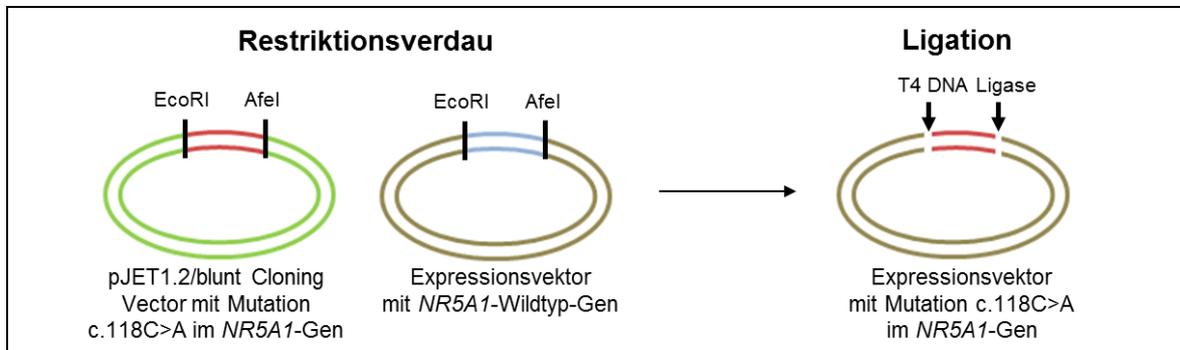


Abb. 8: Restriktionsverdauung und Ligation am Beispiel der Mutation c.118C>A

EcoRI und *AfeI*: Restriktionsenzyme; grün: pJet1.2/blunt Cloning Vector, braun: Expressionsvektor, rot: NR5A1-cDNA-Fragment mit Mutation c.118C>A, blau: NR5A1-Wildtyp-cDNA-Fragment

Transformation

Bei der Transformation werden Plasmide zur Vervielfältigung in Wirtszellen eingebracht. Dafür wurden kompetente *E. coli*-Bakterien (200 µl) verwendet. Nach Antauen der Zellen auf Eis wurden 10 µl des Ligationsansatzes vorsichtig zugegeben. Es erfolgten eine 30-minütige Inkubation auf Eis und ein Hitzeschock für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42°C. Dieser führt zu einer höheren Effizienz der Aufnahme der Plasmide durch die Bakterien. Die Zellen wurden erneut für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zu 800 µl SOC-Medium (pH-Wert: 7; 950 ml deionisiertes H₂O, 20 g Select Peptone/Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g Natriumchlorid, 10 ml Kaliumchlorid 250 mM; davon 100 ml plus 0,5 ml MgCl₂ 2 M und 2 ml Glucose 1 M) gegeben. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37°C und 400 upm im Eppendorf Thermomix (Deutschland) inkubiert. Verschiedene Mengen jeder Zellsuspension wurden auf mit Ampicillin (Konzentration 100 µg/ml) versehenen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank (Memmert, Deutschland) bebrütet.

Für die spätere DNA-Extraktion wurden Flüssigkulturen angesetzt und über Nacht bei 37°C und 220 upm schüttelnd inkubiert.

2.3.3. DNA-Isolierung

Minipräparation

Mit Hilfe der DNA-Minipräparation können kleinere Mengen DNA aus Bakterien isoliert werden. Dazu wurden zunächst 2 ml der Zellsuspension aus der Übernacht-Kultur für 2 Minuten bei 8000 upm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet mit dem GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) nach Angaben des Herstellers verarbeitet.

Die über eine Silika-basierte Membrantechnologie isolierte DNA wurde zunächst im Verhältnis 1:50 mit TE-Puffer (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) verdünnt und die DNA-Konzentration und -Reinheit im Photometer bestimmt. Anschließend wurde die DNA zur Überprüfung der Sequenz nach Sanger sequenziert.

Maxipräparation

Größere Plasmidmengen, die später zur Transfektion eingesetzt werden sollten, wurden mittels Maxipräparation gewonnen. Dazu wurden zunächst Kolonien von den entsprechenden Masterplatten in je 10 ml LB-Medium überführt. Diese Vorkultur wurde für 8 Stunden bei 37°C und 220 upm schüttelnd inkubiert. Für die Hauptkultur wurden 200 ml LB-Medium und 300 µl der Vorkultur gemischt. Sowohl zur Vor- als auch zur Hauptkultur wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden bei gleichen Bedingungen angezüchtet und nach 16 Stunden bei 5000 upm und 4°C für 15 Minuten in der Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments, USA) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mittels des EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Quiagen, Niederlande) nach Angaben des Herstellers verarbeitet.

Die isolierte DNA ist Endotoxin-frei. Endotoxine oder Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Diese können mit anderen Zellen interagieren und beispielsweise Signalkaskaden auslösen, welche die Eigenschaften anderer Zellen verändern. Daher sollten Endotoxine aus der Lösung entfernt werden.

Die extrahierte DNA wurde mit Hilfe des SpeedVac (Savant Thermo Scientific, USA) getrocknet und anschließend in 200 µl endotoxinfreiem TE-Puffer (EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Quiagen, Niederlande) über Nacht bei 4°C resuspendiert. Die Konzentration wurde im BioPhotometer plus (Eppendorf, Deutschland) gemessen.

Es konnten DNA-Mengen zwischen 1200 ng/µl und 4000 ng/µl isoliert werden. Zur Einstellung der Arbeitsverdünnungen auf ca. 100 ng/µl wurde ebenfalls endotoxinfreier TE-Puffer verwendet. Um die gemessenen Konzentrationen zu bestätigen und den Einsatz gleicher Mengen bei der Transfektion zu gewährleisten, wurden die Plasmide

zunächst mittels Restriktionsverdau unter Verwendung des Enzyms *EcoRI*-HF linearisiert. Anschließend wurden sie auf einem Agarosegel aufgetrennt und die Mengen verglichen. Zudem erfolgte eine weitere Sequenzierung der isolierten DNA. Die gelösten Plasmide wurden bei -20°C gelagert.

2.3.4. Sequenzierung der Plasmid-DNA

Zur Kontrolle, ob sowohl die entsprechende Mutation als auch die später benötigten Schnittstellen der Restriktionsenzyme fehlerlos in den Vektor eingebaut wurden, musste die aufgereinigte DNA sequenziert werden.

Die Sequenzierung erfolgte mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Dabei wird nach Anlagerung der Primer an die DNA der zu sequenzierende DNA-Abschnitt durch eine DNA-Polymerase und Zugabe aller vier Basen als Desoxyribonukleosidtriphosphate amplifiziert. Der Kettenabbruch wird erzielt durch Zusatz der Basen als 2',3'-Dideoxyribonukleosidtriphosphate. Bei Einbau dieser Basen ist keine Elongation mehr möglich, da keine freie 3'-OH-Gruppe zur Verfügung steht. Aufgrund der Basenspezifischen Färbung der Dideoxy-Nukleotide mit jeweils einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kann die Sequenz nach Auftrennung der Kettenabbruch-Fragmente durch eine Kapillarelektrophorese mit einem Fluoreszenzscanner detektiert werden.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das entsprechende Cyclers-Programm ist im Anhang zu finden. Es wurden ca. 500 ng DNA und 20 pmol des Forward- oder des Reverse-Primers eingesetzt, wobei je DNA-Probe ein Strang in Sense- und einer in Antisense-Richtung synthetisiert wurde. Dabei nicht gebundene fluoreszenzmarkierte Nukleotide müssen entfernt werden, um eine gut lesbare Sequenz zu erhalten. Die dazu genutzten NucleoSEQ®-Säulen (Macherey-Nagel, Deutschland) enthalten eine Gelfiltrationsmatrix, welche kleine Moleküle wie freie Nukleotide zurückhält, sodass die reine markierte DNA isoliert wird. Hierzu wurde zunächst die trockene Matrix mit dem 750-fachen der Erdbeschleunigung für 30 Sekunden zentrifugiert. Nach Zugabe von 600 µl Aqua bidest. und einer Inkubation von mindestens 30 Minuten zum Quellen der Matrix erfolgte eine weitere Zentrifugation für 2 Minuten. Anschließend wurden die Säulen mit den zu sequenzierenden Proben beladen. Nach einer letzten Zentrifugation für 5 Minuten konnten die Proben für die Sequenzierung verwendet werden.

Die DNA-Sequenz wurde im 4-Kapillarsequenzierer 3130 Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Hitachi, USA) analysiert. Hierbei werden die PCR-Produkte mittels

Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die unterschiedlich markierten Nukleotide durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die Signale werden dann in einem Elektropherogramm dargestellt und mit Hilfe des Programms SeqManager, Lasergene 6.0 (DNASTAR, USA) ausgewertet.

2.3.5. Zellkultur

Zellkulturmedium

Zur Herstellung des Zellkulturmediums wurden 5x Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (D2906, Sigma-Aldrich, USA) und 6 g Natrium-Bicarbonat in 5 Litern Ampuwa®-Spüllösung (Fresenius Kabi, Deutschland) gelöst und der pH-Wert mittels Zugabe von Natriumhydroxid auf 7,3 eingestellt. Das Medium wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde das Medium auf 37°C im Inkubator erwärmt und 10% Fetales Kälberserum (FBS) hinzugefügt. Dieses gewährleistet zum einen ein gutes Wachstum der Zellen. Zum anderen bietet es genug Substrat für das Trypsin, um so dessen Reaktion mit den Zellen zu stoppen.

Auftauen und Anziehen der Zellen

Die HeLa-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Aussäen der Zellen wurden sie zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend 2×10^6 Zellen in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² (Sarstedt, Deutschland) mit 15 ml DMEM und 10 % FBS überführt. Da das Einfriermedium 10% zytotoxisches Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, USA) enthält, erfolgte zu dessen Entfernung am nächsten Tag ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Sämtliche Arbeiten mit diesen Zellen wurden an der Zellkulturbank GELAIRE (GELMAN Instruments, UK) durchgeführt.

Trypsinieren und Zählen der Zellen

Das Umsetzen der Zellen erfolgte alle 72 Stunden. Nach Aussäen von 2×10^6 Zellen in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² bzw. von 4×10^5 Zellen in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² betrug die Konfluenz nach diesem Zeitraum etwa 80 %.

Zunächst wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 37°C warmer, steriler, Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, PBS, Gibco®, Life Technologies, USA) gewaschen. Um die Zellen abzulösen, wurde für 2 Minuten 1 ml

0,05%iges Trypsin, versetzt mit 0,2% EDTA, (TrypGibco®, Life Technologies, USA) zugegeben. Zum Stoppen der Reaktion erfolgte die Aufnahme der Zellen mit 7,5 ml Kulturmedium. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 1000 upm für 5 Minuten und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert.

Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (Fluka Analytical, Schweiz) verdünnt. Die Auszählung erfolgt mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Die entsprechende Menge der Zellen wurde in neue Zellkulturflaschen mit 25 ml (Wachstumsfläche 175 cm²) bzw. 15 ml (Wachstumsfläche 75 cm²) DMEM + 10 % FBS überführt.

Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren wurden HeLa-Zellen einer Zellkulturflasche mit einer Konfluenz von 70-80% wie beschrieben trypsiniert und gezählt. Etwa 2×10^6 Zellen wurden in 1,8 ml kaltes DMEM (70%) mit 20% FBS und 10% DMSO aufgenommen und in Cryo.s™ Einfrierröhrchen (Greiner bio-one, Österreich) überführt. Die Temperatur der Zellen wurde für 24 Stunden in Cryo-Einfriergeräten (Qualifreeze, Qualilab, Frankreich) bei -80°C um 1°C pro Minute gesenkt. Anschließend wurden die Zellen bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.6. Transfektion

Bei der transienten Transfektion wird RNA oder DNA in eukaryote Zellen eingeschleust, ohne dabei in das Genom der Zellen integriert zu werden.

Dazu wurde das Transfektionsreagenz FuGene® HD der Firma Promega (USA) verwendet, welches aus einer kationischen Kopfgruppe und einem Lipidschwanz besteht. Mit dem positiv geladenen Teil bildet FuGene® HD Komplexe mit der negativ geladenen DNA. Die Lipide binden an die Zellmembran der HeLa-Zellen, sodass das Eindringen in das Zellinnere ermöglicht wird. FuGene® HD wurde bei 4°C gelagert und bei Raumtemperatur verwendet. Es wurde in einem Verhältnis zur DNA von 3:1 (µl Fugene/µg DNA) eingesetzt.

Transfektionsassay

Die Transfektionsassays (Abb. 9) wurden auf CELLSTAR® 24-Well Zellkultur Multiwell Platten der Firma Greiner bio-one (Österreich) durchgeführt. Zur späteren Mittelwertberechnung wurden je Mutation Triplikate angelegt.

Pro Well wurden 50000 HeLa-Zellen in 500 µl DMEM und 10 % FBS ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 24 Stunden später erfolgte die Transfektion. Dazu wurden pro Well insgesamt 240 ng DNA eingesetzt. 200 ng des Reporter gens (pSTAR-Luc oder pAMH-Luc) wurden gemeinsam mit 30 ng des jeweiligen SF-1-Expressionsplasmids oder des Leervektors pCMV-Myc und 10 ng der *Renilla*-Luciferase pGL 4.74 transfiziert. Die entsprechende Menge FuGene® HD betrug 0,72 µl je Well. Als Medium wurde DMEM ohne Zusatz von FBS verwendet.

Um eine gute Komplexbildung des FuGene® HD mit den Plasmiden zu erreichen, wurden die Ansätze 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion mit je 12 µl pro Well. Die Platten wurden für 2 Minuten horizontal leicht geschüttelt, um das Reagenz gleichmäßig zu verteilen und anschließend 24 Stunden lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Luciferase-Assay

Vor der Zellyse am nächsten Tag wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit je 500 µl PBS gewaschen. Um die Zellen zu lysieren, wurden pro Well 100 µl Passive Lysis Buffer (Promega, USA) zugegeben. Dieser ermöglicht eine Lyse der Zellen, ohne sie aktiv mit einem Zellschaber ablösen zu müssen. Nach 90-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler wurden aus jedem Well 25 µl in die Wells einer weißen Costar® 96-Well Platte (Corning incorporated, USA) überführt.

Die Messung der Luciferase-Aktivitäten erfolgte im Luminometer (Anthos, Deutschland) mit Hilfe des Dual Luciferase® Reporter Assay System (Promega, USA) nach Angaben des Herstellers. Zuerst wurde die *Firefly*-Luciferase-Aktivität mittels Zugabe des Luciferase Assay Reagent II (LAR II) gemessen. Danach erfolgte die Zugabe des Stop & Glo® Reagent in dasselbe Well zur Erfassung der Aktivität der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase.

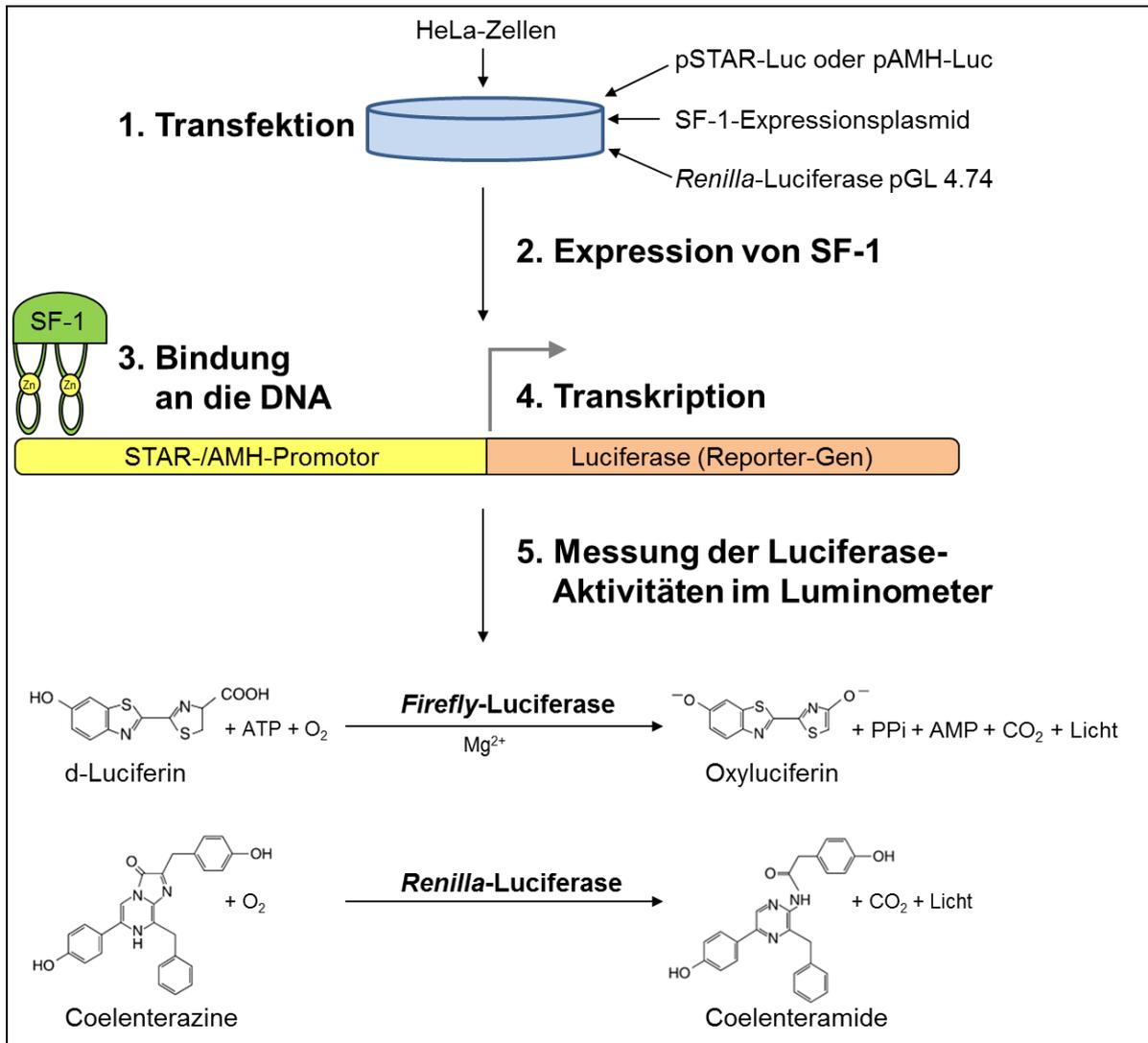


Abb. 9: Schema des Transfektionsassays

(Strukturformeln nach [139])

2.3.7. Western Blot

Die Methode des Western Blots dient dazu, Proteine spezifisch nachzuweisen. Zunächst erfolgt eine Auftrennung der Proteinlysate mittels Gelelektrophorese. Anschließend werden die Proteine auf eine Membran übertragen und mit einem Antikörper markiert. Mit dem Verfahren wird die Akkumulation der Proteine nachgewiesen. Dies kann einen Anhalt dafür geben, ob die Ursache der verminderten Transaktivierungsaktivität der Mutationskonstrukte in einer reduzierten Expression beziehungsweise einem vorzeitigen Abbau der Proteine liegt oder durch einen Funktionsverlust zu erklären ist.

Herstellung der Proteinlysate und Elektrophorese

Um die später für den Western Blot verwendeten Proteine aus den Zellen zu isolieren, erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion zunächst das zweimalige Waschen der Zellen mit je 500 µl PBS. Zur Zellyse wurden 7 ml eiskaltes Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, USA) mit einer Tablette des Proteaseinhibitors Complete Ultra Tablets, Mini (EDTA free, Roche, Schweiz) versetzt und 100 µl pro Well zugegeben. Nach Inkubation der Platten für 5 Minuten auf Eis auf dem Horizontalschüttler wurden die Zellen mittels Zellschaber vom Boden gelöst.

Nach der Entnahme von je 25 µl/Well zur direkten Messung der Luciferase-Aktivität wurde das restliche Lysat zur Homogenisierung des Lysats und zum Entfernen der Zellbestandteile auf eine vorgekühlte Qiashreddersäule (Qiagen, Niederlande) aufgetragen und bei 14000 upm und 4°C für 1 Minute zentrifugiert.

Anschließend wurden 50 µl des Proteinlysats im Verhältnis 1:1 mit gekühltem 2x sample buffer (SDS 4%, Glycerol 20%, Tris-HCl 120 mM, Dithiothreitol 200 mM, pH 6,8) verdünnt und bei 95°C 10 Minuten lang denaturiert. Die Proteine konnten so entweder direkt zur Elektrophorese verwendet oder bei -20°C für kurze Zeit gelagert werden. Die übrigen Proteine wurden nicht mit dem Puffer verdünnt und bei -80°C gelagert.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) werden die Proteine zunächst mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS, sodium dodecyl sulfate) gemischt. Dieses negativ geladene Detergens bindet an die Proteine und überdeckt so deren Eigenladungen. Zudem kommt es durch die Anlagerung und die zuvor erfolgte Denaturierung zur Aufhebung der Proteinstruktur und der Wechselwirkung mit anderen Molekülen. Die Proteine wandern aufgrund der negativen Ladung in Richtung der Anode. Das verwendete Polyacrylamidgel bildet eine Matrix, welche die Proteine je nach ihrer Größe zurückhält. Die Laufstrecke ist also abhängig von der Molekülmasse des Proteins, wobei kleine Proteine weiter im Gel laufen.

Mittels eines 10%igen diskontinuierlichen Acrylamid-Gels, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel (siehe Anhang), wurden je 40 µl der Proteinlysate aufgetrennt. Für einen gleichmäßigen Lauf der Proteine wurde in die leeren Kammern des Gels die gleiche Menge SDS-Puffer aufgetragen. Als Marker wurde die PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN® 3 Cell Kammer (Bio-Rad, USA) unter Verwendung eines Tris-Glyzin-haltigen Elektrodenpuffers (25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 0,1% SDS, H₂O, pH 8,3-8,9) durchgeführt. Bei einer Spannung von 100 V betrug die Laufzeit 120 Minuten.

Blotting und Darstellung der Proteine mittels Anti-cMyc

Beim Blotting wird eine Spannung senkrecht zur Laufrichtung der Elektrophorese an das Gel angelegt, sodass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern. Durch die anschließenden Schritte werden die Proteine mit einem Antikörper markiert und können so später detektiert werden.

Zur Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2 µm, Bio-Rad, USA) wurde das Gel zwischen Whatman-Papier und der Membran in eine Mini Trans-Blot®-Kassette von Bio-Rad eingespannt und mögliche Luftblasen entfernt. Unter Benutzung eines gekühlten, Tris-Glyzin-haltigen Blotting-Puffers (16,5 mM Tris, 150 mM Glyzin, Methanol, H₂O, pH 8,3) betrug die Transferzeit 80 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen und die aufgetragenen Proteinmengen zu vergleichen, wurde anschließend die Membran für drei Minuten mit Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) gefärbt und der Hintergrund mit Aqua dest. ausgespült, sodass unspezifische Protein-Banden sichtbar wurden.

Zur Darstellung der spezifischen Proteinbanden wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4°C in 5% Skim Milk (BD, USA) in PBS mit 0,1% Tween-20 (Sigma-Aldrich, USA) blockiert und anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem an eine Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP) gekoppelten Anti-cMyc-Antikörper (anti-cMyc-Peroxidase, mouse monoclonal antibody, clone 9E10(2), Cat.11814150001, Roche, Schweiz) leicht schwenkend inkubiert. Die Verdünnung des Antikörpers mit 5% Skim Milk in PBS mit 0,1% Tween-20 betrug 1:1000. Um den ungebundenen Antikörper auszuwaschen, wurde die Membran für eine Stunde mit 5% Skim Milk in PBS mit 0,1% Tween-20 gewaschen, wobei der Waschpuffer alle 15 Minuten ausgetauscht wurde. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS für zwei Minuten wurde die Membran für eine Minute mit dem Substrat Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer, USA) inkubiert. Dieses enthält Wasserstoffperoxid und Luminol, welches durch die HRP oxidiert werden kann. Die dabei emittierte Lichtstärke ist proportional zur gebundenen Antikörpermenge. Das Myc-markierte SF-1-Protein kann so mittels Fusion Chemoluminescence Imaging System (Vilber Lourmat, Deutschland) detektiert werden.

Stripping der Membran

Um die Membran später mit einem anderen Antikörper färben zu können, wurde der Anti-cMyc-Antikörper mittels Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, USA) entfernt. Dazu wurde die Membran zunächst mit PBS gewaschen, anschließend für 10 Minuten mit dem Stripping Buffer bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert und erneut kurz mit PBS gewaschen.

Darstellung der Proteine mittels Anti-Aktin

Zur Kontrolle, ob gleiche Proteinmengen der verschiedenen Mutanten aufgetragen wurden, wurde die Membran nach dem Stripping mit einem Anti-Aktin-Antikörper gefärbt. Aktin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts. Es ist in HeLa-Zellen unabhängig von der jeweiligen SF-1-Mutation gleichmäßig vorhanden.

Die Membran wurde zunächst erneut über Nacht bei 4°C blockiert und anschließend mit dem Primär-Antikörper Anti-Actin Affinity isolated Antibody (A2066, rabbit, Sigma, USA) für 60 Minuten inkubiert, wobei die Verdünnung 1:1000 betrug. Nach viermaligem Waschen für je 15 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper Anti-Rabbit (A6154, IgG, HRP-gekoppelt, Sigma, USA) für 60 Minuten bei einer Verdünnung von 1:4000. Da die HRP hier nicht wie beim Anti-cMyc-Antikörper an den Primärantikörper gekoppelt ist, muss die Färbung in zwei Schritten erfolgen. Nach erneutem Waschen wurden die Aktin-Banden mit Western Lightning Plus ECL (PerkinElmer, USA) als Substrat per Fusion Chemoluminescence Imaging System (Vilber Lourmat, Deutschland) detektiert.

2.3.8. RNA-Isolierung

Durch Isolierung der RNA und anschließender Reverser Transkription kann die Akkumulation der mRNA analysiert werden. So können Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob trotz der Mutationen eine regelrechte Transkription der DNA stattfindet.

Zunächst wird nach einer erneuten Transfektion von HeLa-Zellen die RNA isoliert. Das Prinzip der RNA-Isolierung besteht darin, dass das Zelllysate zunächst in einem RNasen-inaktivierenden Puffer gelöst wird. Anschließend durchläuft das Lysat in einem speziellen Hochsalz-Puffer eine Säule zur Entfernung der genomischen DNA, bevor im letzten Schritt, nach Zugabe von Ethanol, die RNA ebenfalls an eine Säule bindet, weitere Bestandteile ausgewaschen werden und schließlich die RNA in Wasser gelöst werden kann. Im Anschluss wird die eventuell noch vorhandene DNA verdaut. Nach Messung der extrahierten RNA wird diese über eine Reverse Transkription in DNA umgeschrieben und anschließend eine PCR durchgeführt, die das Vorhandensein von RNA überprüft.

Transfektion und RNA-Isolierung

300000 HeLa-Zellen je Well wurden in einer 6-Well Platte für 24 Stunden in 3 ml DMEM und 10% FBS inkubiert. Die Zellen wurden transfiziert mit insgesamt 960 ng DNA/Well, zusammengesetzt aus 800 ng des Reportergens pSTAR-Luc, 40 ng der *Renilla*-Luciferase pGL 4.74 und 120 ng des jeweiligen Mutationsplasmids oder des Wildtyps. Nach dem zweimaligen Waschen der Zellen mit je 3 ml PBS nach weiteren 24 Stunden wurde mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Niederlande) die RNA nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Lysat wurde bei -80°C gelagert. 3 µl jeder Probe wurden der Qualitätskontrolle mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA) zugeführt. Zur Kontrolle, ob die gesamte genomische DNA mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit entfernt wurde, erfolgte die Durchführung einer PCR mit den Primern SF1_Ex2-3_IntS_RP sowie SF1_Ex4_IntAS_RP (Sequenzen und PCR-Bedingungen siehe Anhang). Bei noch sichtbaren Banden wurde die DNA zunächst mittels DNase-Verdau entfernt und die RNA anschließend per Phenol-Chloroform-Extraktion erneut isoliert.

DNase-Verdau und Phenol-Chloroform-Extraktion

Zum Verdau der noch vorhandenen DNA wurden zunächst 16 µl jeder RNA-Probe zusammen mit 5 µl des 10x TURBO DNase Puffers, 1 µl der TURBO DNase (beides Life Technologies, USA) und 28 µl RNase-freiem Wasser für 30 Minuten bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl TURBO DNase erfolgte eine weitere Inkubation bei gleichen Bedingungen. Anschließend wurden 150 µl RNase-freies Wasser und 200 µl Phenol-Chloroform zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde gründlich gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten unter Schütteln (1400 upm, Thermomixer comfort, Eppendorf, Deutschland) inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation bei 13000 upm und 4°C für 10 Minuten kam es zu einer Phasenseparation, wobei nach Abnehmen der oberen, wässrigen Phase erneut 200 µl Phenol-Chloroform zugegeben wurden. Inkubation (5 min, 1400 upm), Zentrifugation (5 min, 13000 upm, 4°C) und Abnehmen des Überstandes wurden wiederholt, bevor der Reaktionsansatz mit 20 µl eiskaltem Na-Acetat und 500 µl eiskaltem absolutem Ethanol gemischt und über Nacht bei -20°C gelagert wurde. Am nächsten Tag wurde nach einer Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 upm und 4°C erneut die obere Phase entfernt und 180 µl Ethanol (70%) zugegeben. Nach der letzten Zentrifugation bei gleichen Bedingungen für 10 Minuten und Absaugen des Überstandes wurde die so gefällte RNA für 2 Minuten im SpeedVac (Thermo Scientific, USA) getrocknet und anschließend in 16 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Messung der Reinheit und der extrahierten RNA-Menge erfolgte spektrophotometrisch im NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Anschließend erfolgte eine erneute PCR mit

den zuvor beschriebenen Bedingungen und Primern, um den Erfolg des DNase-Verdau zu überprüfen.

Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde je 1 µg RNA eingesetzt. Der 12 µl umfassende Reaktionsansatz, bestehend aus 1 µl Random-Primer (je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in je 1 mM Tris-HCl, pH 7,5; Life Technologies, USA), 1µl Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix (10 mM, Bioline, UK) und der entsprechenden Menge an RNA und RNase-freiem Wasser, wurde zur Denaturierung der RNA-Sekundärstrukturen und nachfolgenden Primer-Anlagerung für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µl 5x First-Strand Puffer (250 mM Tris-HC, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 µl 0,1 M DTT sowie 1 µl des RNase-Inhibitors RNaseOUT (40 Units/µl, Thermo Scientific, USA) und einer Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur wurde zum Start der Reversen Transkription 1 µl SuperScript™ II RNase H- Reverse Transkriptase (200 Units/µl, Life Technologies, USA) zugefügt. Die SF-1-spezifische cDNA, die als Produkt der Reversen Transkription entstanden ist, wurde nach einer weiteren PCR mit den gleichen Primern wie nach dem DNase-Verdau amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und überprüft.

2.3.9. Isolierung von Kern- und Zytoplasmaextrakten

Zur genauen intrazellulären Lokalisation von SF-1 und zur späteren Durchführung der Electrophoretic Mobility Shift Assays wurden zunächst Kern- und Zytoplasmaextrakte hergestellt und deren Reinheit überprüft. Dazu wurden 300000 HeLa-Zellen pro Well in einer Nunclon™ Surface 6-Well Platte der Firma Thermo Scientific (USA) in 3 ml DMEM und 10% FBS über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurden je 960 ng/Well eines SF-1-Expressionsplasmides oder des Leervektors pCMV-Myc durch Zugabe von 2,88 µl FuGene HD pro Well in die Zellen eingebracht. Nach 2-minütigem Schwenken der Zellen bei Raumtemperatur erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ für 24 Stunden. Am nächsten Tag wurden unter Verwendung des Kits NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers Kern- und Zytoplasmaextrakte der HeLa-Zellen hergestellt. Als Proteaseinhibitor wurde der Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free (Thermo Scientific, USA) eingesetzt. Die Extrakte wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die Reinheit der Extrakte wurde mit Hilfe eines Western Blots durch den Nachweis von zytoplasmatischen und nukleären Markern kontrolliert. Dazu wurden 6 µl jedes Extrakts im

Verhältnis 1:1 mit dem SDS-Puffer verdünnt und für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese, der Blot, die Darstellung von SF-1 mittels des Anti-cMyc-Antikörpers und das anschließende Stripping der Membran wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Zum separaten Anfärben der Membran mit Kern- bzw. Zytoplasmamarkern wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4°C in 5% Skim Milk in PBS mit 0,1% Tween-20 blockiert und anschließend auf Höhe der 55 kDa-Bande geteilt. Die obere Hälfte der Membran wurde mit dem gegen Lamin A, einem Intermediärfilament des Zellkerns, gerichteten Primär-Antikörper ((H-102): sc-20680, Inc., Lot 478657, Santa Cruz Biotechnology, USA) für 60 Minuten bei Raumtemperatur und einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Der untere Abschnitt wurde mit dem gegen ein zytosolisches Protein gerichteten Antikörper Anti-GAPDH (ab9485, Abcam, UK) bei einer Verdünnung von 1:2000 und gleichen Bedingungen markiert. Nach viermaligem Waschen der Membran mit 5% Skim Milk in PBS mit 0,1% Tween-20 für je 15 Minuten erfolgte die Markierung mit dem Sekundär-Antikörper. Dazu diente beiden Teilen der an eine Horseradish-Peroxidase gekoppelte IgG-Antikörper Anti-Rabbit (A6154, Sigma, USA) in einer Verdünnung von 1:2000. Die Detektion der Banden erfolgte wie zuvor beschrieben.

Um gleiche Proteinmengen im EMSA einzusetzen, wurden die Banden mit Hilfe des Programms Bio-ID (Version 15.02, Vilber Lourmat, Deutschland) quantifiziert. Dementsprechend wurden die einzelnen Proteinproben mit dem Kernextrakt des Leervektors verdünnt. Mit diesen Proben wurde erneut ein Western Blot zur Kontrolle der einheitlichen Mengen durchgeführt.

2.3.10. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Prinzip des EMSA

Electrophoretic Mobility Shift Assays werden durchgeführt zur Überprüfung der Fähigkeit eines Proteins, an die DNA zu binden. Hiermit wurden die beiden in der DNA-Bindungsdomäne liegenden Mutationen (p.T40P und p.D18_G22del) und die in der Liganden-Bindungsdomäne liegende Mutation (p.L230R) untersucht. Das Prinzip eines EMSAs besteht darin, dass doppelsträngige Biotin-markierte Oligonukleotide mit einem Proteinkernextrakt inkubiert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert werden. DNA, die kein Protein gebunden hat, ist kleiner und läuft daher weiter im Gel als ein DNA-Protein-Komplex. Um die DNA sichtbar zu machen, muss die DNA entweder radioaktiv oder nicht-radioaktiv markiert werden. In dem hier verwendeten nicht-radioaktivem Verfahren wurden die Duplex-Oligos an einem 5'-Ende durch Biotin markiert. Zur Visualisierung der Biotin-markierten DNA müssen die DNA-

Proteinkomplexe auf eine Nylonmembran transferiert und durch UV-Crosslinking fixiert werden. Die DNA wird dann in verschiedenen Schritten mit einer Streptavidin-Horseradish-Peroxidase markiert. Nach Zugabe des Substrats können die Banden mittels Fusion Chemoluminescence Imaging System (Vilber Lourmat) detektiert werden. Als Kontrolle wird eine Reaktion ohne Zugabe des SF-1-Proteins angesetzt (Kernextrakt aus mit pCMV-Myc transfizierten Zellen). Zum Beweis der Spezifität der Bindung von SF-1 an die DNA wurden in dieser Arbeit zum einen Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz wie zuvor und ohne Biotin-Markierung im 200-fachen Überschuss zum beschriebenen Reaktionsansatz zugefügt. Diese sollen eine Kompetition der Bindung von SF-1 an die Biotin-markierten Oligonukleotide bewirken. Zum anderen wurden die gleichen Reaktionen mit Oligonukleotiden angesetzt, die eine Mutation in der SF-1-Bindungsdomäne enthalten, sodass SF-1 hier nicht binden kann und keine Kompetition mit der markierten DNA erfolgt (Abb. 10).

Reaktionsansätze

Die im EMSA verwendeten Oligonukleotide entsprechen einer Sequenz im murinen *Amh*-Promotor und enthalten das SF-1-Bindungsmotiv 5'-CCAAGGTCA-3'. Das Einfügen einer Mutation in diese Sequenz erfolgte durch Austausch von zwei Basen. Die Oligonukleotide wurden von Campbell et al. in SF-1-spezifischen EMSAs verwendet [16] und von Metabion International AG (Deutschland) hergestellt. Die EMSAs wurden mit Hilfe des Light Shift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt. Je Mutation wurden vier verschiedene Reaktionen angesetzt (Abb. 10). Die Proteine wurden auf Eis aufgetaut. Zur Vermeidung starker unspezifischer Interaktionen wurden die Reaktionsansätze vor Zugabe der Biotin-markierten DNA für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die korrekte Funktion der Komponenten des Kits wurde durch einmalige Durchführung des vom Hersteller empfohlenen Control EBNA Systems überprüft.

	Reaktion	Reaktion			
		# 1	# 2	# 3	# 4
Kernextrakt 	-	+	+	+	
Unmarkierte Ziel-DNA 	-	-	+	-	
Unmarkierte mutierte DNA 	-	-	-	+	
Biotin-markierte Ziel-DNA 	+	+	+	+	

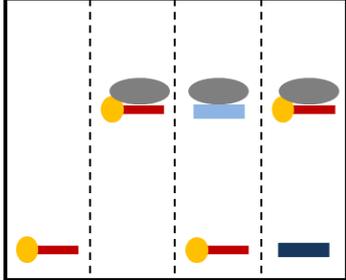


Abb. 10: EMSA-Reaktionsansätze

+ = im Ansatz vorhanden, - = nicht im Ansatz vorhanden, gelb = Biotin
(nach [140])

Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Blotting und Detektion

Für die Elektrophorese wurden jeder Probe 5 µl des 5x Ladepuffers zugefügt und 20 µl jedes Reaktionsansatzes auf ein 6%iges nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (siehe Anhang) aufgetragen. Unter Verwendung von 0,5x TBE (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 25 mM EDTA+Na; pH 8) als Puffer wurde die Spannung von 100 V solange angelegt, bis die Bande des Bromphenolblau $\frac{3}{4}$ der Länge des Gels gelaufen war.

Zum Tank-Blotting wurde die neutrale Nylon-Membran Hybond-Nx von Amersham Pharmacia Biotech (UK) und als Puffer gekühltes 0,5x TBE verwendet. Nach einer Blottingzeit von 60 Minuten bei einer Spannung von 100 V in der Mini-PROTEAN® 3 Cell Kammer (Bio-Rad, USA) wurde die DNA mittels UV-Crosslinking im UV-Crosslinker von Vilber Lourmat (Deutschland) bei einer Intensität von 120 mJ/cm² auf der Membran fixiert. Die Detektion der Biotin-markierten DNA-Protein-Komplexe auf der Membran durch die Streptavidin-Horseradish-Peroxidase wurde mit Hilfe des Chemoluminescent Nucleic Acid Detection Modules (Thermo Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Signale wurden mittels Fusion Chemoluminescence Imaging System (Vilber Lourmat, Deutschland) detektiert.

Im letzten Schritt wurde die Membran wie bereits beschrieben gestriipt und mit dem Anti-cMyc-Antikörper gefärbt. Dadurch kann in der Probe mit 200-fachem Überschuss an Ziel-DNA das Vorliegen von SF-1 an den detektierten Banden belegt werden, da hier eine

große Menge DNA an die Membran gebunden hat und so zur Detektion ausreichend SF-1 gebunden wurde.

Transfektionen, Western Blots und EMSAs wurden je mindestens drei Mal durchgeführt und die Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Transaktivierungsassays

Um den Einfluss der *NR5A1*-Mutationen auf die Transaktivierungskapazität von SF-1 an dessen Zielgenen zu untersuchen, wurden Reportergen-Assays durchgeführt. Die eingesetzten Reportergene, pSTAR-Luc und pAMH-Luc, enthalten kurze Promotorbereiche des *AMH*- und des *STAR*-Gens (Abb. 6). Diese stellen Zielgensequenzen von SF-1 *in vivo* dar und sind an ein Leuchtkäfer-Luciferasegen gekoppelt, welches durch Aktivierung der Promotoren ebenfalls transkribiert wird. So konnte die Transaktivierungskapazität von SF-1 indirekt anhand der Leuchtkäfer-Luciferaseaktivität im Luminometer gemessen werden.

Die Aktivität des SF-1-Wildtyps wurde auf 100% gesetzt. Im Vergleich dazu zeigten die mutierten SF-1-Proteine eine stark eingeschränkte Fähigkeit, die Reportergene zu aktivieren (Abb. 11). Am *AMH*-Promotor zeigte sich eine Reduktion der relativen Transaktivierung bei der Mutante p.T40P auf $7,93 \pm 0,89$ %, bei p.D18_G22del auf $7,42 \pm 0,85$ %, bei p.V128CfsX168 auf $2,73 \pm 0,52$ %, bei p.Y211TfsX83 auf $7,28 \pm 1,37$ % und bei p.L230R auf $7,78 \pm 0,61$ %. Die Messwerte der Aktivierung des *STAR*-Promotors lagen etwas unter denen des *AMH*-Promotors. So betrug die Aktivität bei der Mutante p.T40P $3,10 \pm 0,16$ %, bei p.D18_G22del $2,99 \pm 0,20$ %, bei p.Y211TfsX83 $5,85 \pm 0,33$ % und bei p.L230R $4,36 \pm 0,48$ %. Mit $0,84 \pm 0,09$ % zeigte der Klon p.V128CfsX168 auch an diesem Promotor die geringste Aktivität. Die Standardabweichungen waren damit in beiden Assays sehr gering.

Zur Darstellung der Hintergrundaktivität von SF-1 in den HeLa-Zellen wurde auch die Aktivität des Leervektors pCMV-Myc gemessen. Diese betrug in den mit dem *AMH*-Promotor transfizierten Zellen $1,61 \pm 0,27$ %, in den mit dem *STAR*-Promotor transfizierten Zellen $0,45 \pm 0,06$ %. HeLa-Zellen produzieren demnach selbst kein SF-1, welches die Ergebnisse verfälschen könnte. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Messwerte der SF-1-unabhängig exprimierten *Renilla*-Luciferase normalisiert.

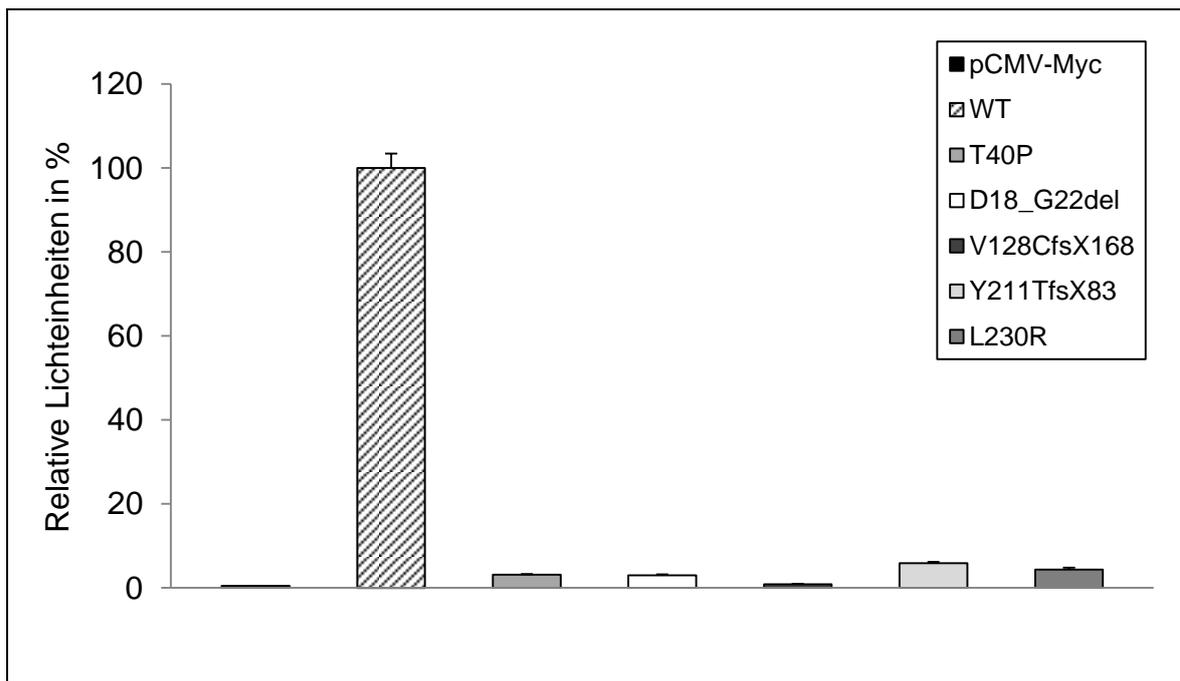
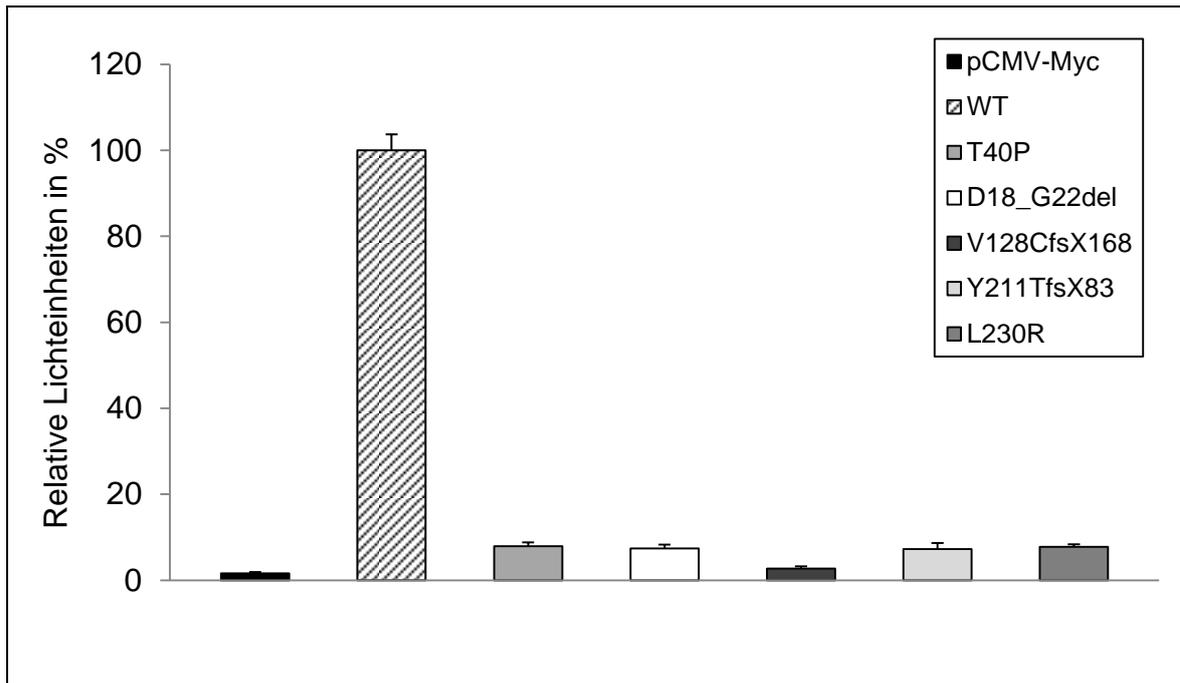


Abb. 11: Relative Transaktivierung des *AMH*- und *STAR*-Promotors durch SF-1

HeLa-Zellen wurden mit einem Reporter gen (pAMH-Luc oder pSTAR-Luc), der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase pGL 4.74 und entweder dem SF-1-Wildtyp (WT), dem Leervektor pCMV-Myc oder einer Mutationsvariante kotransfiziert. Die Luciferaseaktivitäten wurden im Luminometer gemessen und die Aktivität des Wildtyps auf 100% gesetzt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte drei unabhängiger, in Triplikaten durchgeführter Versuche. Die Fehlerbalken stellen die positive Standardabweichung dar.

3.2. Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots wurde die Expression von SF-1 untersucht. So kann überprüft werden, ob die verminderte Aktivität der mutierten Proteine im Transaktivierungsassay auf eine verminderte Akkumulation des Proteins zurückzuführen ist oder auf eine Einschränkung der Funktionalität.

Dazu wurden HeLa-Zellen zunächst mit den entsprechenden SF-1-Expressionskonstrukten transfiziert, die Proteine isoliert und eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blotting durchgeführt. Der Expressionsvektor enthält einen zehn Aminosäure langen Myc-tag, welcher N-terminal mit dem SF-1-Protein fusioniert vorliegt und zur Detektion von SF-1 dient.

Die Färbung mit dem Anti-Myc-Antikörper zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine ähnliche Expression des SF-1-Proteins, welches die Punktmutationen p.T40P und p.L230R oder die *inframe*-Deletion p.D18_G22del enthält. Bei diesen Proben zeigt sich eine Bande etwas unterhalb von 55 kDa (Abb. 12). Dies entspricht der Größe des Konstruktes aus SF-1-Wildtyp und cMyc von 54,8 kDa. Durch diese Mutationen werden demnach weder die Proteintranslation und –stabilität wesentlich beeinträchtigt noch die Proteinelänge verändert. Auch das Protein mit der Mutation p.Y211TfsX83 wird exprimiert. Durch die *frameshift*-Mutation kommt es allerdings zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese und somit zu einer Verkürzung des Proteins auf 35 kDa. Auf dieser Höhe zeigt sich im Western Blot eine Bande, die jedoch deutlich schwächer ist als die des Wildtyps. Dies könnte eine mögliche Degradierung des Proteins aufgrund der veränderten Struktur anzeigen. Beim Protein mit der Mutation p.V128CfsX168 ist keine Bande zu erkennen. Die Mutation verursacht durch Verschiebung des Leserasters ebenfalls ein vorzeitiges Stoppcodon, welches im Gegensatz zur zuvor beschriebenen Mutation sehr viel näher am ursprünglichen Stoppcodon liegt. Das resultierende Protein müsste eine Größe von 53,4 kDa haben, also ähnlich zum Wildtyp. Auf dieser Höhe zeigt sich keine Bande. Das Protein wird demnach entweder nicht exprimiert oder vorzeitig abgebaut. Die beiden Negativkontrollen, mit pCMV-Myc transfizierte und untransfizierte HeLa-Zellen, zeigen ebenfalls keine spezifische Bande auf Höhe des SF-1-Proteins. Es wird demnach kein endogenes Myc exprimiert, welches die Ergebnisse beeinflussen könnte.

Das Auftragen vergleichbarer Proteinmengen in allen Proben konnte zum einen durch die unspezifische Färbung der Proteine mit Ponceau S nachgewiesen werden (Abb. 13A). Zum anderen zeigt die Markierung mit dem SF-1-unabhängigen Marker Aktin eine weitgehende Übereinstimmung der Mengen in den gesamten Proben (Abb. 13B).

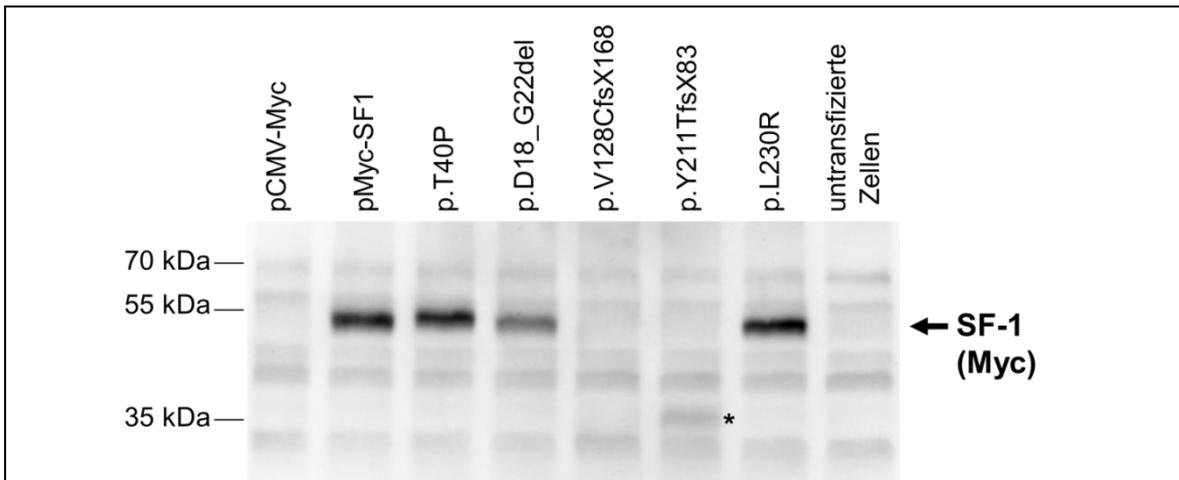


Abb. 12: Darstellung von SF-1 mittels Anti-cMyc im Western Blot

HeLa-Zellen wurden mit einer Variante der cMyc-SF-1-Fusionsproteine, dem *STAR*-Reportergen und der konstitutiv exprimierten *Renilla*-Luciferase kotransfiziert und die Zelllysate mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Immundetektion erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Anti-cMyc-Antikörper. Als Negativkontrollen dienten mit dem Leervektor pCMV-Myc transfizierte sowie untransfizierte HeLa-Zellen.

Das verkürzte Protein mit der Mutation p.Y211TfsX83 ist mit * gekennzeichnet.

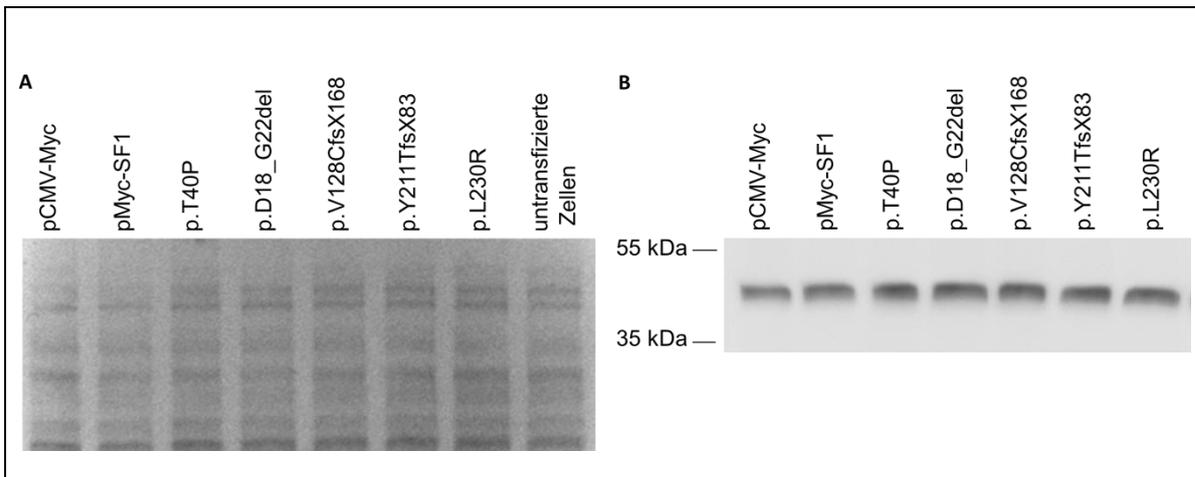


Abb. 13: Bestätigung des Einsatzes gleicher Proteinmengen im Western Blot

A) Zur unspezifischen Färbung sämtlicher Proteine wurde die Membran mit Ponceau S-Lösung gefärbt.

B) Die Membran aus Abb. 12 wurde gestrippt und zur Darstellung des SF-1-unabhängig exprimierten Zytoskelettproteins Aktin die Proteine mittels des Primär-Antikörpers Anti-Aktin und des Sekundär-Antikörpers Anti-Rabbit detektiert.

3.3. RNA-Isolierung und Reverse Transkription

Da die *NR5A1*-Expressionsklone mit den *frameshift*-Mutationen (p.V128CfsX168 und p.Y211TfsX83) keine oder nur schwache Signale im Western Blot aufwiesen, wurde die RNA-Expression der Klone in HeLa-Zellen anhand von RNA-Isolierung und anschließender RT-PCR überprüft.

Die Qualität der RNA wurde mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA) kontrolliert. Hierbei wird die RNA fluoreszenzmarkiert und der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Komponenten werden in ein Elektropherogramm übersetzt, welches die Auswertung der RNA-Qualität ermöglicht. Zur standardisierten Bestimmung der Integrität der isolierten RNA wurde die RNA Integrity Number (RIN) verwendet. Diese wird über einen Algorithmus ermittelt, der das komplette elektrophoretische Spektrum in die Berechnung einbezieht. Die RIN kann zwischen 1 (= höchst degradierte RNA) und 10 (= intakte RNA) liegen. In dieser Arbeit konnten RIN-Werte zwischen 9,40 und 9,70 erzielt werden (Abb. 14). Demnach lag eine sehr gute Qualität der RNA vor, sodass die RNA in der Reversen Transkription eingesetzt werden konnte.

Die Menge der extrahierten RNA wurde im NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) bestimmt. Die Konzentrationen lagen zwischen 323 ng/µl und 467 ng/µl.

Zur Kontrolle, ob nach der RNA-Isolierung noch Plasmid-cDNA in den Proben vorhanden war, wurde diese über eine *NR5A1*-spezifische PCR detektiert. Da die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase nur einen DNA-Strang als Matrize nutzen kann, entsteht ein PCR-Produkt nur, falls noch Plasmid-DNA enthalten ist. Nach Auftrennung der Proben zeigte sich in allen Proben eine Bande auf Höhe von ca. 250 Basenpaaren, was der erwarteten Fragmentgröße bei noch vorhandener Plasmid-DNA entspricht (Abb. 15A). Um diese Kontamination zu entfernen, wurde ein DNaseI-Verdau mit einer Turbo DNase (Ambion, USA) durchgeführt und anschließend der Erfolg durch eine erneute PCR bestätigt, in der keine Banden mehr sichtbar waren (Abb. 15B). Im nächsten Schritt wurde die RNA in einer RT-PCR mittels Superscript II Reverse Transkriptase (Thermo Scientific, USA) in cDNA umgeschrieben und wie zuvor beschrieben amplifiziert. Hierbei zeigte sich bei allen Klonen ein gleichmäßiges PCR-Produkt (Abb. 16). Dies beweist das Vorliegen von *NR5A1*-Transkripten. Die *NR5A1*-cDNA wird also von allen Klonen transkribiert. Eine fehlende Transkription des Expressionsklons ist damit nicht die Ursache der im Western Blot nicht bzw. nur schwach zu detektierenden Proteine mit den *frameshift*-Mutationen.

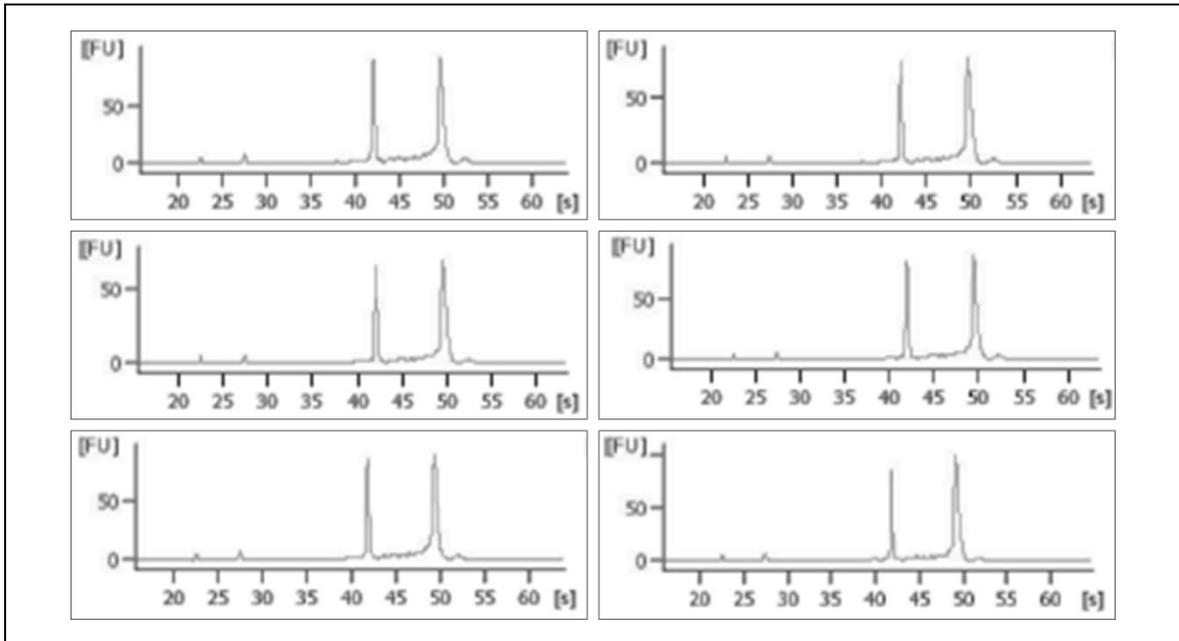


Abb. 14: RNA-Qualitätskontrolle I

HeLa-Zellen wurden mit je einem SF-1-Expressionsplasmid, dem Reporter gen pSTAR-Luc sowie der *Renilla*-Luciferase pGL 4.74 transfiziert und die RNA 24 Stunden später isoliert. Die Qualitätskontrolle der RNA erfolgte mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA).

Die Fluoreszenz-Signale FU der unterschiedlichen RNA-Komponenten werden in Abhängigkeit der Zeit s dargestellt. Die beiden großen Peaks des Elektropherogramms stellen die Hauptbestandteile eukaryotischer rRNA, die 18S-RNA und 28S-RNA, dar.

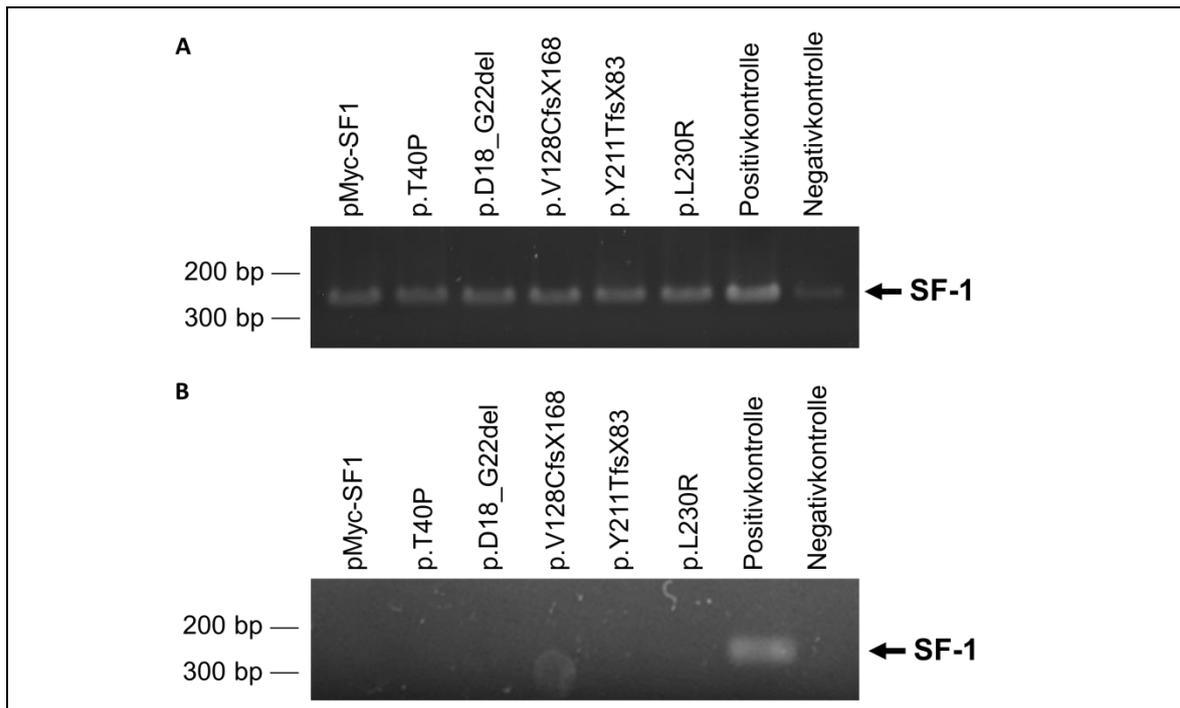


Abb. 15: RNA-Qualitätskontrolle II

A) Es wurde eine *NR5A1*-spezifische PCR mit den Proben der RNA-Isolierung durchgeführt, um die RNA-Proben auf Plasmid-cDNA-Kontamination zu untersuchen.

B) Die kontaminierten RNA-Proben aus A) wurden mittels TURBO DNase verdaut und die RNA in einer Phenol-Chloroform-Extraktion erneut isoliert. Das vollständige Entfernen der Plasmid-DNA in diesen Proben wurde mit Hilfe einer weiteren PCR bestätigt.

In beiden PCRs wurden die Intron-überspannenden Primer aus Exon 3 und Exon 4 (SF1_Ex2-3_IntS_RP: 5'-caagatgcgacaagacgcag-3' und SF1_Ex4_IntAS_RP: 5'-gcagcagtagtccgggtg-3') verwendet.

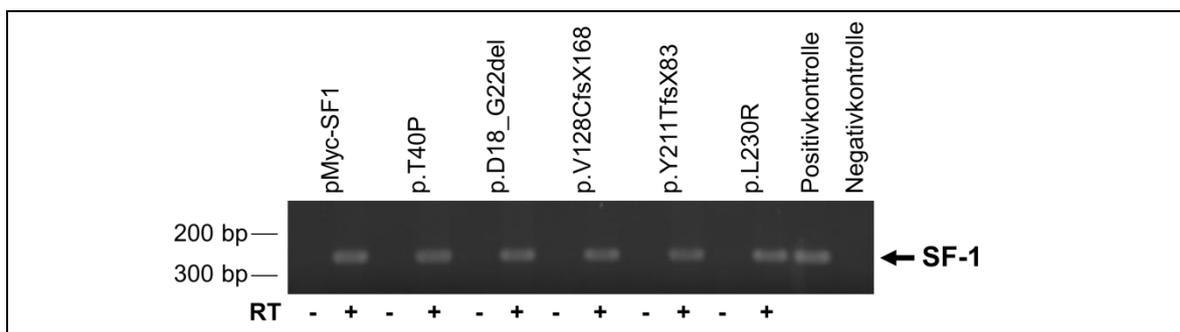


Abb. 16: Reverse Transkription (RT)

Mit der isolierten RNA wurde eine Reverse Transkription durchgeführt und die Amplifikate im Agarosegel aufgetrennt (RT +). Zur Kontrolle des vollständigen Verdauens der Plasmid-DNA in den RNA-Proben wurde gleichzeitig eine PCR mit den Produkten der RNA-Isolierung ohne Reverse Transkription durchgeführt (RT -).

3.4. Intrazelluläre Lokalisation der SF-1-Proteine

Zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation der SF-1-Mutanten wurden Kern- und Zytoplasmaextrakte aus den mit den Klonen p.T40P, p.D18_G22del sowie p.L230R transfizierten HeLa-Zellen hergestellt und mit denen des Wildtyps verglichen. Die Proteinextrakte wurden auf einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Das nukleär lokalisierte Protein Lamin A, die überwiegend im Zytoplasma vorkommende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sowie SF-1 wurden mit den spezifischen Antikörpern Anti-Lamin A ((H-102): sc-20680, Santa Cruz Biotechnology, USA), Anti-GAPDH (ab9485, Abcam, UK) und Anti-cMyc (clone 9E10(2), Roche, Schweiz) nachgewiesen.

SF-1 konnte bei jeder Mutation sowohl im Kern als auch im Zytoplasma nachgewiesen werden. Besonders beim Wildtyp und der Mutante p.L230R zeigte sich, dass SF-1 im Kern in höherem Maß vorkommt als im Zytoplasma. Dies entspricht der Erwartung bei einem als Transkriptionsfaktor fungierenden Protein. Auch bei den beiden anderen Mutationen zeigt sich ein leichtes Überwiegen von SF-1 im Zellkern, wobei dies im Verhältnis zum Wildtyp sehr viel schwächer ausgeprägt ist (Abb. 17A).

Zudem zeigte sich, dass Lamin A nur in den Kernextrakten und GAPDH überwiegend in den Zytoplasmaextrakten nachweisbar war (Abb. 17B). Die Kompartimente konnten demnach gut getrennt werden.

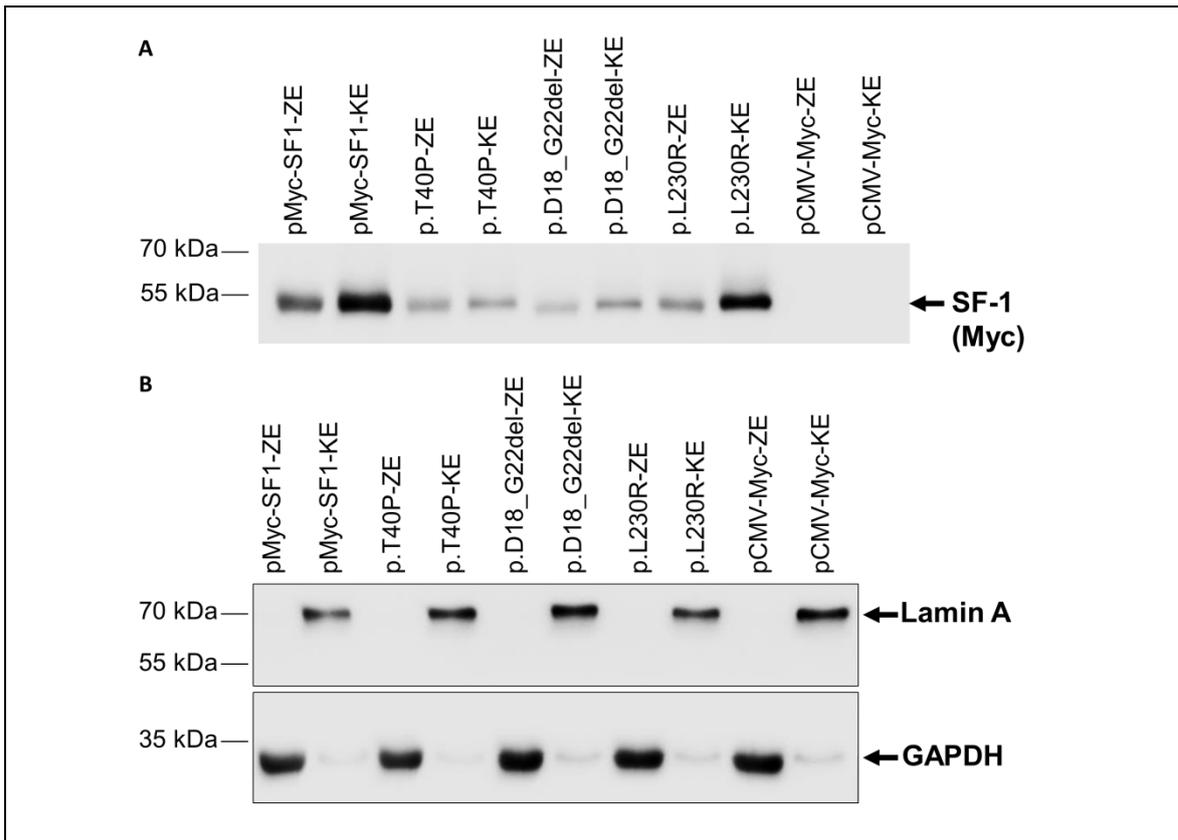


Abb. 17: Detektion der Zytoplasma- und Kernextrakte im Western Blot

A) Markierung der Zytoplasma (ZE)- und Kernextrakte (KE) mit Anti-cMyc: HeLa-Zellen wurden entweder einem SF-1-Expressionsplasmid oder dem Leervektor pCMV-Myc transfiziert und die Kern- und Zytoplasmaproteine separat extrahiert. Die Proteine wurden wie in Abb. 12 beschrieben aufgetrennt und detektiert.

B) Getrennte Markierung der Kern- und Zytoplasmaextrakte mit Lamin A und Anti-GAPDH: Die Membran aus A) wurde auf Höhe von 55 kDa geteilt. Der obere Abschnitt wurde mit dem Primär-Antikörper Lamin A markiert, der untere Teil mit dem Primär-Antikörper Anti-GAPDH. Als Sekundär-Antikörper wurde für beide Abschnitte der an eine Horseradish-Peroxidase gekoppelte IgG-Antikörper Anti-Rabbit verwendet.

3.5. Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von SF-1

Mit Hilfe von Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) wurden der SF-1-Wildtyp, die in der DNA-Bindungsdomäne liegenden SF-1-Mutationsvarianten p.T40P und p.D18_G22del und das SF-1-Protein mit der in der Ligandenbindungsdomäne liegenden Mutation p.L230R hinsichtlich ihrer DNA-Bindungskapazität untersucht.

Dazu wurden die Kernextrakte der mit den verschiedenen SF-1-Expressionsplasmiden transfizierten HeLa-Zellen verwendet, da SF-1 als nukleärer Rezeptor im Kern aktiv ist.

Zunächst wurde das Vorhandensein von SF-1 in einem weiteren Western Blot überprüft (Abb. 17A). Die Stärke dieser Banden wurde quantifiziert, um gleiche Mengen im EMSA einsetzen zu können. Zur Verifizierung erfolgte eine Kontrolle der entsprechenden Verdünnungen im Western Blot. Diese zeigt, dass weitestgehend gleiche Mengen verwendet wurden und alle Proben SF-1 enthalten (Abb. 18).

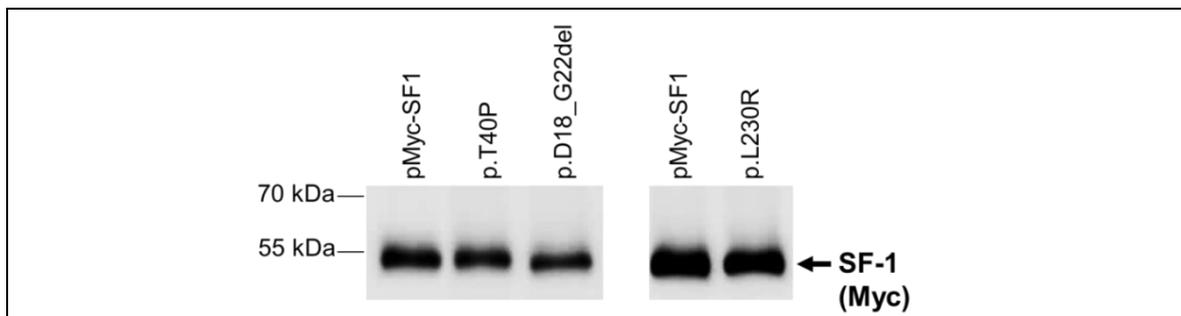


Abb. 18: Kontrolle der im EMSA verwendeten SF-1-Proteinmengen

Nach Quantifizierung der Banden aus Abb. 17A und entsprechender Verdünnung der Proben mit dem Kernextrakt des Leervektors wurde ein weiterer Western Blot durchgeführt zur Bestätigung des Einsatzes vergleichbarer SF-1-Proteinmengen im EMSA.

Anhand der Reaktionen des SF-1-Wildtyps kann das Prinzip des EMSA verdeutlicht werden (Abb. 19A). Im ersten Reaktionsansatz sind im Gegensatz zur zweiten Probe nur Biotin-markierte Oligonukleotide mit einem SF-1-spezifischen Bindungsmotiv und kein Kernextrakt enthalten, sodass die freie DNA weit im Gel laufen kann. In der zweiten Reaktion wird die DNA durch die Interaktion von SF-1 mit dem entsprechenden Bindungselement zurückgehalten. Es wird eine entsprechende Bande oberhalb der Bande von Probe 1 sichtbar. Die Spezifität dieser Bindung kann auf verschiedene Weisen nachgewiesen werden. Zum einen führt im dritten Reaktionsansatz die Zugabe eines 200-fachen Überschusses an nichtmarkierter DNA, welche die gleiche Sequenz wie die markierte DNA aufweist, zu einer Konkurrenz der Bindung von SF-1 an die markierte DNA. Durch den hohen Überschuss an unmarkierter DNA ist SF-1 jetzt überwiegend

damit gesättigt. Die markierte freie DNA wandert daher wieder weiter im Gel und zeigt die entsprechende Bande auf gleicher Höhe wie im ersten Reaktionsansatz, wobei auf Höhe der Bande aus Reaktion 2 nun kein Signal mehr sichtbar ist. Ein weiterer Nachweis der spezifischen Protein-DNA-Interaktion wird mit dem vierten Reaktionsansatz erbracht. Die Zugabe eines 200-fachen Überschusses von unmarkierten Oligonukleotiden mit einer mutierten SF-1-Bindungsstelle bewirkt keine Aufhebung der Bindung von SF-1 an die markierte DNA. Die Höhe der Bande verändert sich hier nicht. Die markierte, spezifische DNA ist also weiterhin an SF-1 gebunden.

Die Ergebnisse des EMSAs zeigen, dass keine Bindung an die DNA stattfindet, wenn SF-1 eine der Mutationen p.T40P und p.D18_G22del enthält (Abb. 19A). Die markierten, spezifischen Oligonukleotide laufen auch nach Zugabe des Kernextraktes weit im Gel. Sie werden also nicht durch die mutierten SF-1-Proteine zurückgehalten. Dies kann den im Transaktivierungsassay nachgewiesenen Funktionsverlust von SF-1 im Falle dieser beiden Mutationen erklären, da ohne Möglichkeit der DNA-Bindung die Funktion des Transkriptionsfaktors nicht mehr ausgeübt werden kann.

Wie Abbildung 19A zeigt, führt im Gegensatz dazu die Mutation p.L230R nicht zu einem vollständigen Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit von SF-1. Bei Zugabe des Kernextraktes zu der markierten, spezifischen DNA wird eine Bande auf der gleichen Höhe wie beim Wildtyp sichtbar, allerdings sehr viel schwächer. Passend dazu zeigt sich eine leichte Bande auf Höhe der weit im Gel gelaufenen, ungebundenen markierten Oligonukleotide. Dies deutet auf eine weniger starke Bindung des mutierten Proteins an die DNA im Vergleich zum Wildtyp hin. Ein Teil der markierten DNA kann daher weiter im Gel wandern. Die Protein-DNA-Interaktion wird hier ebenfalls durch Zugabe des 200-fachen Überschusses an unmarkierter DNA aufgehoben. Außerdem kommt es nicht zur Konkurrenz der Bindung durch die im SF-1-Bindungsmotiv mutierte DNA. Dies weist auch hier die Spezifität der Bindung von SF-1 an das Bindungselement der DNA nach.

Um zu überprüfen, ob an der Position der detektierten Bande SF-1 nachgewiesen werden kann, wurde die Membran gestriipt und mit dem Anti-cMyc-Antikörper markiert (Abb. 19B). Durch das UV-Crosslinking wird das Protein über die DNA an die Membran gebunden, sodass ausschließlich DNA-Protein-Komplexe sichtbar werden und kein ungebundenes Protein. In der ersten Spur ist jeweils kein Signal sichtbar, weil in diesen Proben kein Protein enthalten ist. Da in der zweiten Spur nur sehr geringe Mengen der markierten DNA vorliegen und die gebundene Proteinmenge nicht ausreicht, um im Western Blot durch den Anti-Myc-Antikörper detektiert zu werden, ist hier ebenfalls kein Signal sichtbar. Jedoch zeigt sich bei den Proben des Wildtyps und der Mutation p.L230R in der dritten Spur ein Signal auf gleicher Höhe wie die Bande von SF-1 im EMSA. Durch die Bindung einer sehr viel größeren Menge an DNA mit dem SF-1-Bindungsmotiv (200x

Überschuss im Reaktionsansatz) kann eine deutlich höhere Menge an SF-1 durch UV-Crosslinking über die DNA auf der Membran fixiert werden. Diese Menge ist ausreichend, um das gebundene SF-1 durch den cMyc-Antikörper nachzuweisen. Dadurch wird bestätigt, dass SF-1 das Protein ist, welches die DNA im EMSA bindet. In der vierten Spur dieser beiden Proben kann eine deutlich schwächere Bande detektiert werden, da die Oligonukleotide mit dem mutierten SF-1-spezifischen Bindungselement ebenfalls etwas SF-1 binden können, jedoch mit einer stark verminderten Aktivität. Bei den Proben der Mutationen p.T40P und p.D18_G22del zeigt sich kein Signal, da die mutierten Proteine nicht an die DNA binden können und so keine DNA-Protein-Komplexe entstehen.

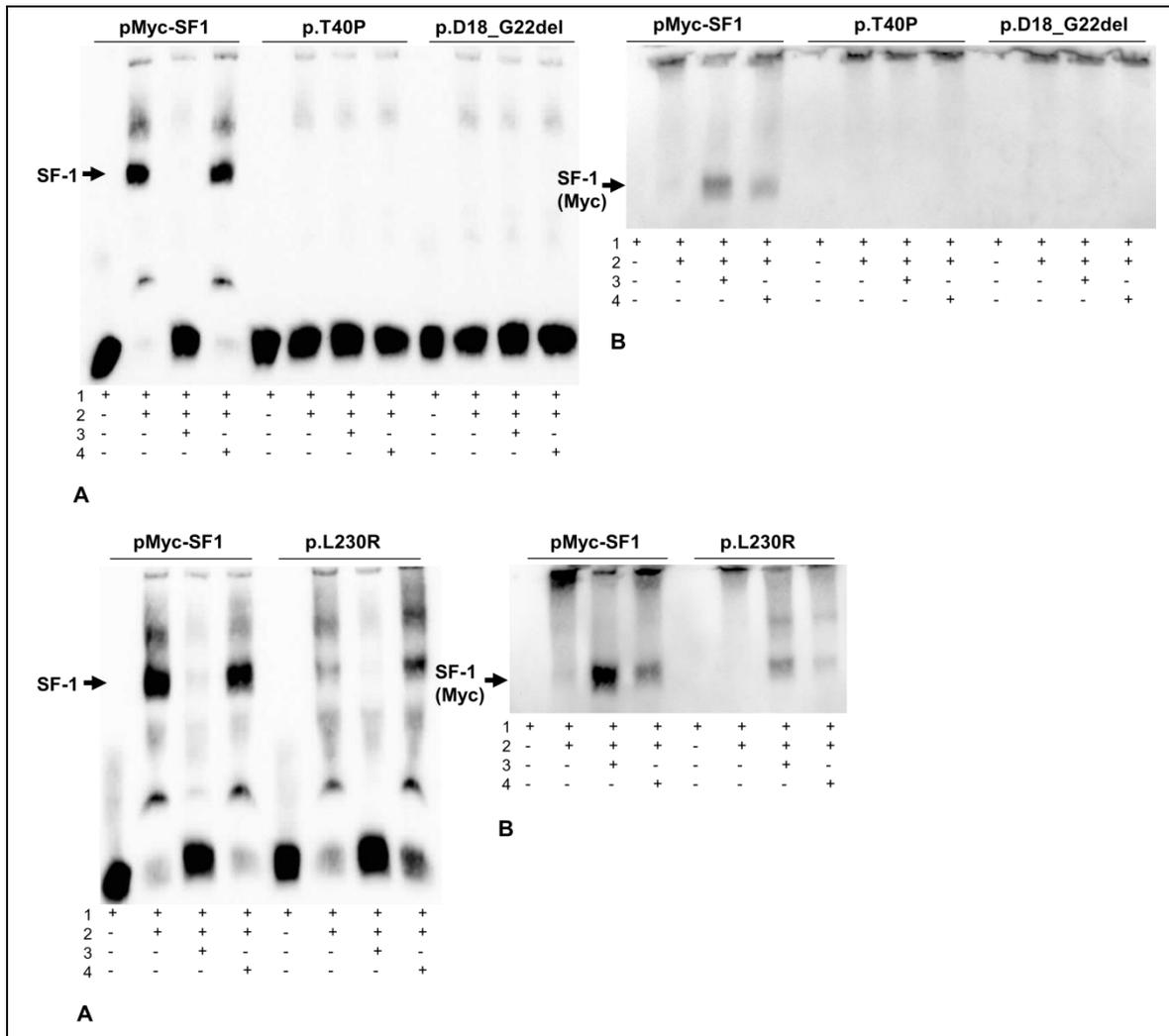


Abb. 19: Darstellung der DNA-Bindungs Kapazität von SF-1 im EMSA

(1: Biotin-markierte Ziel-DNA, 2: SF-1 Kernextrakt, 3: Unmarkierte Ziel-DNA (200x Überschuss), 4: Unmarkierte mutierte DNA (200x Überschuss))

A) HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 17 beschrieben transfiziert und die isolierten Kernextrakte im EMSA eingesetzt. Die Oligonukleotide enthalten das SF-1-Bindungsmotiv 5'-CCAAGGTCA-3' des murinen *Amh*-Promotors [16]. Das Bindungselement wurde durch Austausch von zwei Basen zu 5'-CCAATTTCA-3' verändert, um die unspezifischen Oligonukleotide zu erhalten.

B) Markierung des EMSAs mit Anti-cMyc: Die im EMSA verwendete Membran wurde gestrippt und mit dem Anti-cMyc-Antikörper markiert. Nach Detektion von SF-1 wurde die Höhe der entsprechenden Banden auf beiden Bildern verglichen.

4. Diskussion

Mutationen im *NR5A1*-Gen führen zu einem breiten Spektrum an Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung, wobei die zugrunde liegende Pathophysiologie bislang nicht ausreichend erklärt werden konnte. Eine Aussage über eine genaue Genotyp-Phänotyp-Korrelation kann demnach bisher nicht getroffen werden. Zur Entwicklung möglicher Erklärungsansätze für die genetische Grundlage dieser Phänotypen wurden in der vorliegenden Arbeit fünf bislang noch nicht beschriebene Mutationen im *NR5A1*-Gen, die bei Patientinnen und Patienten mit DSD nachgewiesen werden konnten, bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Funktionalität, die Proteinexpression sowie die DNA-Bindungsfähigkeit von SF-1 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass jede der fünf Mutationen zu einer starken Reduktion der Transaktivierungsaktivität von SF-1 führt, wobei die Proteinexpression außer bei den *frameshift*-Mutationen nicht wesentlich eingeschränkt ist. Zudem kommt es durch die in der DNA-Bindungsdomäne liegenden Mutationen zu einem vollständigen Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit, wohingegen die Mutation in der Ligandenbindungsdomäne nur zu einer Reduktion der DNA-Bindungskapazität von SF-1 führt.

4.1. Möglichkeiten und Grenzen der Transaktivierungsassays

4.1.1. Begrenzte Zahl der untersuchten Promotoren

Zunächst wurden Reporterassays durchgeführt, mit denen die Expression bestimmter Gene in einem vereinfachten Zellmodell analysiert werden kann [36]. Wie bereits in anderen Studien [93] und auch mittels des Leervektors pCMV-Myc gezeigt werden konnte, besitzen die verwendeten HeLa-Zellen keine endogene SF-1-Aktivität, welche die Ergebnisse verfälschen könnte. Gerade steroidogene Zellen, wie beispielsweise adrenale NCI-H295R-Zellen, wurden bewusst nicht eingesetzt, da in diesen die Hintergrundaktivität von SF-1 zu hoch ist und so die Ergebnisse nicht verwertbar sind [15].

Als Reportergene wurden AMH-Luc sowie STAR-Luc ausgewählt, da sie als Zielgene von SF-1 entscheidende Rollen in der Geschlechtsentwicklung spielen [24,102]. Zudem kommt StAR in steroidogenen Zellen und AMH in nicht-steroidogenen Zellen vor, sodass verschiedene Arten der SF-1-Zielzellen repräsentiert wurden. Trotzdem kann so die Aktivität der Mutanten nicht vollständig analysiert werden. Beispielsweise beschrieben Camats et al. *NR5A1*-Mutationen, die an verschiedenen steroidogenen Promotoren eine

unterschiedliche Aktivität aufwiesen [15]. Auch die zuerst identifizierte Mutation p.G35E zeigt eine aufgehobene Bindung an den *CYP11A1*-, *LHβ*- und *DAX1*-Promotoren, wohingegen die Bindung an den *AMH*- und *Aromatase*-Promotor stattfinden konnte [44]. Zur genaueren Charakterisierung der hier untersuchten Mutationen könnte also die Transaktivierungsaktivität an weiteren Promotoren getestet werden.

Die zur Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität von SF-1 verwendeten Oligonukleotide wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich zu DNA-Bindungsanalysen mit SF-1 eingesetzt. Die enthaltene Sequenz 5'-CCAAGGTCA-3' entspricht dem SF-1-Bindungsmotiv im murinen *Amh*-Promotor [16]. Es konnte gezeigt werden, dass die Proteine mit den Mutationen p.D18_G22del und p.T40P nicht mehr, das Protein mit der Mutation p.L230R nur vermindert an die Oligonukleotide binden können. Da AMH ein wichtiges Zielgen von SF-1 darstellt, wurden die Ergebnisse exemplarisch auch für andere SF-1-Zielgene gewertet. Jedoch unterscheiden sich beispielsweise die SF-1-Bindungsmotive des *STAR*-Promotors von denen des *AMH*-Promotors [101]. Eine erhaltene Bindungsaktivität der mutierten SF-1-Proteine an anderen Promotoren, welche die Ausprägung des Phänotyps beeinflusst, kann somit durch diese Experimente nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2. Eingeschränkte Übertragbarkeit von *in vitro*-Ergebnissen

Insgesamt wurden alle Experimente in Triplikaten mit mindestens drei unabhängigen Assays durchgeführt. So konnten aussagekräftige Ergebnisse mit geringen Standardabweichungen erzielt werden. Allerdings stellen diese Zellmodelle ein sehr vereinfachtes System dar, sodass die Resultate der *in vitro*-Assays nicht ohne Einschränkungen auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen werden können. Es wurde lediglich die Auswirkung der einzelnen Mutationen auf die SF-1-Proteine untersucht, die physiologischen Bedingungen jedoch weitestgehend unberücksichtigt gelassen. So liegen beispielsweise alle Mutationen bei den Patienten heterozygot vor, sodass noch ein funktionsfähiges Allel existiert. In den Analysen wurde aber jeweils nur das mutierte Allel untersucht. Ein dominant-negativer Effekt eines mutierten SF-1-Proteins konnte bislang von den meisten Arbeitsgruppen nicht nachgewiesen werden [1,12,40,44,51,81]. Camats et al. konnten jedoch zeigen, dass bei einigen Mutanten der Verlust der Transaktivierungsaktivität durch Kotransfektion mit dem Wildtyp wieder aufgehoben werden kann [15]. Ob und in welchem Ausmaß diese Kompensation auch im menschlichen Körper stattfinden kann, bleibt bislang ungeklärt.

Fehlende Interaktionen mit Kofaktoren

Zudem wurden in den Zellmodellen die Interaktionen mit Kofaktoren unberücksichtigt gelassen, die in menschlichen Zellen für einen Großteil der experimentell analysierten Funktionen von SF-1 eine wichtige Rolle spielen. Für die vollständige Aktivierung des eingesetzten *AMH*-Promotors sind beispielsweise die Transkriptionsfaktoren WT-1 und GATA4 zusätzlich zu SF-1 notwendig [61,113]. Wie frühere Studien zeigen konnten, sind diese ebenfalls nicht in HeLa-Zellen enthalten, sodass SF-1 hier nicht die vollständige Aktivität entfalten kann [69]. Auch die Bindung der DNA-Bindungsdomäne von SF-1 an die DNA kann durch Kofaktoren modifiziert werden [63], was in diesen Zellmodellen nicht abgebildet wird. Weitere Untersuchungen mit anderen Zellmodellen oder Zugabe der entsprechenden Kofaktoren könnten ein realistischeres Bild ergeben.

Einfluss weiterer genetischer Veränderungen

Des Weiteren wurden nur Vektoren mit jeweils einer Mutation im *NR5A1*-Gen in die HeLa-Zellen eingebracht. Zum Beispiel konnte bei allen Betroffenen mit der Mutation p.Y211TfsX83 auch ein Polymorphismus im *AR*-Gen identifiziert werden. Dieser Polymorphismus führt zu einer Reduktion der AR-Aktivität auf 60-65% [125]. Es ist denkbar, dass eine verminderte Androgenbiosynthese aufgrund der Gonadendysgenese in Verbindung mit diesem Polymorphismus zu einer deutlich reduzierten Aktivierung der AR-Zielgene führt. Die Auswirkung der Kombination einer *NR5A1*-Mutation mit dem Polymorphismus wurde allerdings in den hier durchgeführten Analysen nicht untersucht. Auch eine mögliche Modulation der SF-1-Aktivität bzw. des Phänotyps durch die Mutation im *TBX2*-Gen, die sowohl bei Patientin 4b als auch bei ihrer Mutter in der Exom-Sequenzierung identifiziert werden konnte, wurde in dieser Arbeit nicht überprüft. Das *TBX2*-Gen spielt eventuell eine Rolle in der Geschlechtsentwicklung [28] und könnte daher zu einer Variation des Phänotyps führen.

Zudem wurde nur bei dieser Familie eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Bei den anderen Patienten ist weiterhin offen, ob eine weitere Mutation in einem für die Geschlechtsentwicklung bedeutenden Gene vorhanden ist. Aufgrund der vielfältigen Interaktion von SF-1 mit weiteren Faktoren ist es nämlich denkbar, dass eine Mutation in einem der anderen an der Geschlechtsentwicklung beteiligten Gene den Phänotyp beeinflussen könnte.

4.1.3. Zusammenfassung zur Methodik

Trotz dieser Einschränkungen der Reporter-gen-Assays liefern die Ergebnisse erste Hinweise auf die Bedeutsamkeit der *NR5A1*-Mutationen und stellen damit die Grundlage für weitergehende Analysen dar. Beispielsweise könnten mit der Methode des *Genome Editing* Mutationen gezielt in das Genom von Mäusen eingebracht werden und so direkt die Auswirkungen auf die Geschlechtsentwicklung in den Mäuseembryonen untersucht werden. Zunächst werden beim *Genome Editing* mit Hilfe von Endonukleasen Doppelstrangbrüche erzeugt und dann im Rahmen der DNA-Reparatur Mutationen in die DNA eingebracht. Als Nukleasen dienen zum Beispiel Zinkfinger-nukleasen, *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) oder das CRISPR/Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-System. Besonders letzteres macht das gleichzeitige Einbringen von mehreren Mutationen in die DNA möglich, was beispielsweise bei der Kombination der Mutation p.Y211TfsX83 mit dem AR-Polymorphismus interessant wäre [8,128]. Allerdings wären auch Ergebnisse aus solchen Experimenten nur eingeschränkt auf den menschlichen Körper übertragbar, da gerade bei *NR5A1*-Mutationen einige phänotypische Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen auftreten. So weisen heterozygote *NR5A1-Knockout*-Mäuse stets regelrechte Geschlechtsorgane auf und sind fertil. Lediglich homozygote *Knockout*-Mäuse besitzen keine Gonaden [86]. Trotzdem könnten so die Auswirkungen der beschriebenen Mutationen in einer Umgebung untersucht werden, die eher den physiologischen Verhältnissen entspricht, als es bei Verwendung von HeLa-Zellen möglich ist.

4.2. Strukturelle Analyse der einzelnen Mutationen

Im Western Blot zeigte das SF-1-Protein mit der Mutation p.D18_G22del (c.51_65del) eine ähnliche Expression wie der Wildtyp. Allerdings fiel im Transaktivierungsassay eine stark verminderte Aktivität des mutierten Proteins auf, was vermutlich durch die im EMSA nachgewiesene aufgehobene DNA-Bindungs-fähigkeit erklärt werden kann. Die Mutation befindet sich im ersten Zinkfinger, der an der DNA-Bindung beteiligt ist [44]. Durch die Deletion von 15 Nukleotiden kommt es zu einer Verkürzung des Proteins um fünf Aminosäuren (p.D18_G22del). Dies lässt eine starke Konformationsänderung des Zinkfingers und somit eine gestörte Interaktion mit der DNA vermuten. Auch die zuvor beschriebenen Punktmutationen p.V20L und p.Y25C in genau diesem Bereich führen zum Verlust der Transaktivierungsaktivität von SF-1 [15,130].

Die Mutation c.118A>C in Exon 3 bedingt einen Aminosäureaustausch zwischen den beiden Zinkfingern (p.T40P). Bei dieser Mutation konnte im Western Blot ebenfalls eine

vergleichbare Bande wie die des Wildtyps nachgewiesen werden, wobei der Funktionsverlust im Transaktivierungsassay auch auf die fehlende DNA-Bindung im EMSA zurückgeführt werden kann. Dies lässt sich wiederum durch die Lage der Mutation nahe der P-Box erklären, welche zusammen mit der A-Box die Bindung von SF-1 an die DNA stabilisiert [44]. Durch die Mutation kommt es wahrscheinlich zu einer starken Änderung der Konformation von SF-1, da eine hydrophile durch eine hydrophobe Aminosäure ausgetauscht wird. Dies stört die Interaktion mit den benachbarten Aminosäuren K38 und R39, welche die Bindung an Hormon-responsive Elemente vermitteln [63]. Die Interaktion von SF-1 mit der DNA wird so beeinträchtigt. Weitere beschriebene Mutationen in dieser Region führen ebenfalls zu einer verminderten Aktivität von SF-1 [1,51,78]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Zinkfinger für die Funktionsfähigkeit von SF-1.

Die Punktmutation c.689T>G in Exon 4 führt im Transaktivierungsassay ebenfalls zu einer stark verminderten Aktivität des Proteins bei vergleichbarer Proteinexpression gegenüber dem Wildtyp. Wie vermutet ist die DNA-Bindungsfähigkeit im EMSA bei der in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) liegenden Mutation nicht aufgehoben. Allerdings kommt es zu einer abgeschwächten Bindung im Vergleich zum Wildtyp, welche eventuell aus der Konformationsänderung des Proteins resultiert. Durch die Mutation kommt es auf Proteinebene zum Austausch einer hydrophoben durch eine hydrophile Aminosäure in der N-terminalen Ligandenbindungsdomäne (p.L230R). Diese Strukturänderung betrifft die Aktivierungsdomäne-1, welche zusammen mit der LBD eine Bedeutung für die aktive Konformation von SF-1 und somit auch für die Bindung von SF-1 an die DNA hat [26,37]. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine eingeschränkte DNA-Bindungskapazität bei Mutationen in der LBD nachweisen [12,21,132], was für eine Beteiligung zumindest der N-terminalen LBD an der DNA-Bindung spricht. Der C-terminale Abschnitt der LBD scheint für die DNA-Bindung eine geringere Rolle zu spielen. Dies suggerieren zum einen Untersuchungen hier gelegener Mutationen ohne Einschränkung der DNA-Bindungskapazität [62,81]. Zum anderen ist besonders die Helix 12 der LBD an der Interaktion mit Koaktivatoren und eben nicht an der DNA-Bindung beteiligt [85].

Obwohl die DNA-Bindung durch die Mutation p.L230R nicht komplett aufgehoben wird, ist die Transaktivierungsaktivität in gleichem Maße vermindert wie durch die zuvor beschriebenen Mutationen p.D18_G22del und p.T40P. Die Aktivität von SF-1 muss also durch die Mutation p.L230R über weitere Mechanismen eingeschränkt werden. Eine ebenfalls in der proximalen LBD gelegene Mutation (p.R313C) führt zu einem Verlust der synergistischen Wirkung von SF-1 und GATA4 [3]. Die beiden Transkriptionsfaktoren erzielen normalerweise über eine gemeinsame Bindung an den *AMH*-Promotor eine additive Wirkung auf die Transkriptionsaktivität [113]. Zudem ist in der LBD eine

Bindungstasche für Phospholipide lokalisiert, welche endogene Liganden darstellen und unter anderem für die Interaktion mit Kofaktoren von Bedeutung sind. Bei fehlender Ligandenbindung kann SF-1 seine vollständige Aktivität nicht entfalten [53,60,85,122]. Denkbar wäre daher, dass die eingeschränkte Transaktivierungsaktivität der p.L230R-Mutante auf die fehlende Wirkung dieser oder anderer in HeLa-Zellen nicht vorhandener Kofaktoren zurückzuführen ist.

Die Mutation c.630_636del resultiert in einer Verschiebung des Leserasters. Hier zeigt sich ebenfalls eine stark reduzierte Transaktivierungsaktivität im Reporterassay. Das Protein ist schwach im Western Blot nachweisbar, wobei es entsprechend des vorzeitigen Stoppcodons eine geringere Größe als der Wildtyp aufweist.

Auch die Mutation c.382del führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese mit Verkürzung des resultierenden Proteins (p.V128CfsX168). Die Transaktivierungsaktivität war mit 2,73% am *AMH*-Promotor und 0,84% am *STAR*-Promotor im Vergleich zu den anderen Mutanten am stärksten eingeschränkt, wobei das vollständige Fehlen des Proteins im Western Blot einen möglichen Erklärungsansatz darstellt. Da die RNA-Analysen eine Transkription des mutierten *NR5A1*-Konstruktes bestätigten, könnte entweder die Translation in den HeLa-Zellen durch die Mutation gestört oder das Protein aufgrund der stark veränderten Proteinstruktur nach der Synthese rasch degradiert werden. *In vivo* könnte die mRNA auch im Rahmen des *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) abgebaut werden. Beim NMD werden während der Translation vorzeitige Stoppcodons erkannt und daraufhin die mRNA abgebaut, sodass keine fehlgefalteten Proteine entstehen [17].

Da den *frameshift*-Mutationen große Teile des Proteins fehlen und sie eine fast vollständig aufgehobene Transaktivierungsaktivität zeigen, wurden keine weiteren Analysen bezüglich dieser Mutationen durchgeführt.

4.2.1. Korrelation zwischen der Lage der Mutation im Protein und dem Phänotyp

Andere Arbeitsgruppen stellten die Hypothese auf, dass Mutationen, die in der LBD liegen, zu einer geringeren Einschränkung der Transaktivierungsaktivität führen als Mutationen in der DBD [15,29]. Diese Vermutung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die untersuchten Mutationen in der DBD sowie in der LBD führten zu einer vergleichbaren Reduktion der Transaktivierungsaktivität. Gegen diese These spricht ebenso die Tatsache, dass der resultierende Phänotyp der in der LBD lokalisierten Mutation mit komplett weiblichen Genitalien bei Geburt und erst zur Pubertät auftretenden

Virilisierung schwerwiegender war als der Phänotyp der Betroffenen mit den Mutationen in der DBD, welche jeweils mit ambivalenten externen Genitalien bereits bei Geburt auffielen. Obwohl der direkte Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen aufgrund unterschiedlicher Promotoren in den Transaktivierungsassays nur eingeschränkt anwendbar ist, lässt sich zurzeit noch keine genaue Korrelation zwischen der Lage der Mutation in der DBD oder der LBD und dem entsprechenden Phänotyp ableiten.

Anders verhält es sich mit in der Hinge-Region gelegenen Mutationen. Wie Tantawy et al. zusammenfassend beschrieben, führen *nonsense*-Mutationen in der Hinge-Region zu verschiedenen Phänotypen wie unterschiedliche Formen von 46,XY DSD oder POI, wohingegen *missense*-Mutationen in der Hinge-Region lediglich bei Patienten mit mildem Phänotyp im Sinne einer männlichen Infertilität beschrieben wurden [111]. Auch in dieser Arbeit stellen die Mutationen p.V128CfsX168 und p.Y211TfsX83, welche in der Hinge-Region liegen, *nonsense*-Mutationen dar, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führen. Die Patientinnen 3 und 4b, die diese Mutationen tragen, weisen ebenfalls einen schwerer wiegenden Phänotyp mit stark verminderter Virilisierung auf. Um eine genaue Korrelation zu bestätigen, sind allerdings weitere Analysen größerer Patientengruppen notwendig.

4.2.2. Einschränkung der nukleären Lokalisation durch Mutationen in der DBD

Interessanterweise wurden bisher keine Liganden für SF-1 identifiziert, die über Bindung an die Ligandenbindungsdomäne zu einer Translokation in den Zellkern führen, wie es von anderen nukleären Rezeptoren, wie beispielsweise dem Androgenrezeptor, bekannt ist [34]. Vielmehr scheint für die Kernlokalisierung von SF-1 eine Sequenz in der DNA-Bindungsdomäne entscheidend zu sein, ohne die es zu einer verminderten Translokation kommt [37,59]. Dies wird durch die Ergebnisse der Isolation der Kern- und Zytoplasmaextrakte in dieser Arbeit untermauert. Wie bei einem nukleären Rezeptor erwartet, werden sowohl der Wildtyp als auch alle Mutanten im Zellkern stärker nachgewiesen als im Zytoplasma. Allerdings ist das Signal der Kernextrakte der beiden in der DBD gelegenen Mutationen im Vergleich zum Wildtyp und zur in der LBD gelegenen Mutation p.689T>G im Verhältnis zum Signal der Zytoplasmaextrakte sehr viel schwächer. Eine Erklärung könnte sein, dass bei erhaltener DNA-Bindungsfähigkeit der SF-1-Proteine diese im Zellkern akkumulieren, was bei den Mutationen p.D18_G22del und p.T40P dann nicht der Fall wäre. Des Weiteren ist eine Beeinträchtigung des Kernlokalisierungssignals durch die Mutationen in der DBD möglich. Ähnliche Ergebnisse konnten von anderen Arbeitsgruppen erzielt werden. Die Mutation p.Y25C zeigte ebenfalls ein vermindertes nukleäres

Signal, wobei durch die noch weiter proximal gelegene Mutation p.V15M gar keine nukleäre Translokation mehr stattfand [62,130]. Viele der in der LBD gelegenen Mutationen führen dagegen nicht zu einer Einschränkung der Kernlokalisierung [9,21,81,132].

4.3. Phänotypische Variabilität bei Patientinnen und Patienten mit *NR5A1*-Mutationen

Trotz eingeschränkter Übertragbarkeit der *in vitro* erzielten Ergebnisse kann nach den ausführlichen funktionellen Analysen der einzelnen Mutationen davon ausgegangen werden, dass diese das SF-1-Protein stark beeinträchtigen und so zur Ausprägung des jeweiligen 46,XY DSD-Phänotyps beitragen. Eine zuverlässige Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist jedoch nicht möglich, unter anderem da offenbar unterschiedliche Mutationen zu dem gleichen Phänotyp führen können. So wurde in der Literatur eine Patientin beschrieben, die ähnlich wie die in dieser Arbeit untersuchte Patientin 5 (p.L230R) bei Geburt komplett weibliche externe Genitalien aufwies und sich mit 10 Jahren aufgrund einer Virilisierung vorstellte. Auch die Histologie entsprach mit einem Sertoli-cell-only-Syndrom dem Ergebnis der histologischen Untersuchung einer Gonadenbiopsie bei Patientin 5. Allerdings ließ sich als Mutation eine Deletion von sieben Basenpaaren im letzten Exon des *NR5A1*-Gens nachweisen, die zu einer Verschiebung des Leserasters mit Verlust des Stoppcodons und damit zu einer Elongation des Proteins führt [99]. Eine strukturelle Ähnlichkeit der beiden Mutanten lässt sich demnach nicht feststellen.

Im Gegensatz dazu wurden jedoch auch Mutationen beschrieben, die bei unterschiedlichen Patienten zu ganz verschiedenen Phänotypen geführt haben. Sogar innerhalb einiger Familien konnte bei Vorliegen der gleichen Mutation ein breites phänotypisches Spektrum nachgewiesen werden. Dieses reichte von lediglich Diskrepanzen in den Hormonwerten [22] bis hin zu einem Patienten mit vermindert virilisierten externen Genitalien, dessen Zwillingsbruder keine klinischen Auffälligkeiten zeigte [81]. Die Mutation p.W279X konnte innerhalb einer Familie bei beiden Kindern mit 46,XY-Karyotyp nachgewiesen werden, wobei ein Kind als Junge, das andere als Mädchen aufwuchs. Der Sohn wies einen Mikropenis, eine Hypospadie sowie ein Scrotum bipartitum auf und zeigte keine Müller-Strukturen. Bei ihm kam es zu einem spontanen Eintritt in die Pubertät. Die Tochter der Familie fiel mit einer Klitoromegalie auf. Müller-Strukturen waren vorhanden. Zudem trugen beide Kinder und deren Mutter die Introndeletion g3314-3317delTCTC, die zu abweichenden Splicevarianten führen kann. Im gonadalen Gewebe der Tochter konnte dementsprechend die Expression einer verkürzten Variante des

NR5A1-Gens nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten daher, dass dies die Ursache für die Variabilität darstellen könnte [123]. Bei Unterschieden in der Zusammensetzung des Spliceapparates könnten verschiedene Splicevarianten bei den Geschwistern auftreten und so der variable Phänotyp erklärt werden. Eine histologische Untersuchung der Gonaden des Sohnes mit Nachweis einer veränderten Splicevariante liegt zur Unterstützung dieser Hypothese jedoch nicht vor.

Ein weiteres Beispiel der intrafamiliären Variabilität stellt die Mutation p.Arg92Trp dar, die ebenfalls bei Betroffenen mit ganz unterschiedlichen Phänotypen gefunden werden konnte. Unter anderem wurde sie bei drei Mitgliedern einer Familie identifiziert, wobei ein Kind mit 46,XY-Karyotyp einen vorwiegend weiblichen Phänotyp aufwies, das zweite Kind mit 46,XX-Karyotyp männliche äußere Genitalien mit einer Hypospadie zeigte und bei der Mutter bis auf eine unregelmäßige Menstruation keine Auffälligkeiten nachgewiesen werden konnten. Auch eine andere Familie mit der gleichen Mutation wurde beschrieben, bei der die Mutter ebenfalls weitestgehend asymptotisch war und beide Kinder eine ovotestikuläre DSD aufwiesen. Die Autoren vermuten als Ursache dieser intrafamiliären Variabilität unter anderem eine unvollständige Penetranz, sodass sich die Merkmale unterschiedlich ausprägen [8].

Eine unvollständige Penetranz wäre auch eine mögliche Erklärung für die intrafamiliäre Variabilität einer der in dieser Dissertation untersuchten Familien. Die Mutation p.Y211TfsX83 (c.630_636del) fand sich sowohl beim Sohn (46,XY) der Familie, der bei Geburt eine skrotale Hypospadie, eine reduzierte Penislänge und ein Scrotum bipartitum aufwies, keine Müller-Strukturen hatte und dessen Hormonwerte im Normbereich lagen, als auch bei der Tochter (46,XY), die mit 15 Jahren mit einer primären Amenorrhoe und einer Klitoromegalie auffiel, nachdem sie bei Geburt komplett weibliche externe Genitalien zeigte. Ein Uterus konnte nachgewiesen werden, die Testosteronwerte waren leicht erhöht bei stark erhöhten Gonadotropinen und erniedrigtem Inhibin B (siehe Anhang). Auch die phänotypisch unauffällige Mutter (46,XX) trug die Mutation. Bei allen Betroffenen konnte zwar auch eine polymorphe Verkürzung einer Polyglycin-Sequenz im *AR*-Gen identifiziert werden. Dies scheint als Erklärung der Variabilität jedoch unwahrscheinlich, da der Polymorphismus zum einen bei allen drei Familienmitgliedern auftrat. Zum anderen hat der Androgenrezeptor keinen Einfluss auf die Bildung des Uterus und kann somit nicht den Phänotyp von Patientin 4b erklären.

In der sowohl bei den Kindern als auch bei den Eltern durchgeführten Exom-Sequenzierung wurde nach weiteren Mutationen gesucht, die nicht bei beiden Kindern vorkommen und damit eine mögliche Ursache für den variablen Phänotyp darstellen können. Dabei konnte eine Mutation im *TBX2*-Gen nachgewiesen werden, die nur bei Patientin 4b und der Mutter auftritt. *TBX2* wird im Maus-Embryo im Hodeninterstitium, in

den Wolff- und den Müller-Gängen exprimiert und ist wahrscheinlich an der Entwicklung der Leydig-Zellen sowie der Differenzierung der Wolff-Gänge beziehungsweise der Müller-Gangs-Regression beteiligt [28]. Dies wurde zwar lediglich in Mäusen nachgewiesen, es ist jedoch möglich, dass *TBX2* auch im menschlichen Embryo eine Rolle bei der Geschlechtsentwicklung spielt. So könnten Mutationen in diesem Gen den Phänotyp ebenfalls beeinflussen und zu der intrafamiliären Variabilität beitragen.

Eine ähnliche phänotypische Konstellation wie bei dieser Familie wurde ebenfalls bei einer Familie beschrieben, die eine fast identische Mutation (c.630_637del) aufwies [6]. Diese Mutation führt ebenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters (p.Y211PfsX12). Der Indexpatient weist einen ähnlichen Phänotyp auf wie Patient 4a mit ebenfalls normwertigen Hormonen. Die Mutation c.630_637del fand sich ebenso bei der phänotypisch unauffälligen Mutter (46,XX), was auch eine Parallele zu der Familie aus dieser Arbeit darstellt.

Einen möglichen Erklärungsansatz für diese intrafamiliären Unterschiede stellt der bereits erwähnte Mechanismus des *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) dar. Durch den Abbau von mRNA, die ein vorzeitiges Stoppcodon enthält, kann es bei verschiedenen Erkrankungen, wie beispielsweise dem Marfan-Syndrom, zu einer verminderten Anzahl an fehlgefalteten Transkripten und dadurch zu einer weniger schwerwiegenden Ausprägung des Phänotyps kommen [27]. Die Aktivität des NMD selbst wird wiederum durch verschiedene Faktoren reguliert, wobei unter anderem Stress, der zum Beispiel durch Hypoxie oder Infektionen entstehen kann, eine wichtige Rolle spielt [50]. Da sowohl die Mutation p.W279X als auch die Mutationen c.630_636del und c.630_637del *frameshift*-Mutationen darstellen, ist es also denkbar, dass intrauterine Faktoren die Aktivität des NMD bei den Geschwistern moduliert haben. Daraus könnte eine unterschiedliche Anzahl an SF-1-Transkripten resultieren, wodurch es wiederum zu einer variablen Ausprägung des Phänotyps kommen könnte.

Zudem liegt jede der hier erwähnten Mutationen im C-terminalen Teil des Proteins. Somit sind zumindest die DNA-Bindungsdomäne sowie die A-Box unbeeinträchtigt. Ob diese Tatsache zur unterschiedlichen klinischen Ausprägung beiträgt oder ob weitere Faktoren ursächlich für die große Variabilität sind, sollte in weiteren Analysen eruiert werden.

4.3.1. Gly146Ala-Polymorphismus als Modulator des phänotypischen Schweregrades

In verschiedenen Arbeiten wurde eine Assoziation eines schwerer wiegenden Phänotyps mit der Kombination einer *NR5A1*-Mutation und dem p.Gly146Ala-Polymorphismus im *NR5A1*-Gen postuliert. Die Prävalenz dieses Polymorphismus variiert laut ExAC-Browser-Daten zwischen 76% in der afrikanischen und 1,4% in der europäischen Bevölkerung [141]. Der Polymorphismus bedingt eine Verminderung der Transaktivierungsaktivität von SF-1 an den *CYP11A*- und *CYP19*-Promotoren um 20-35 %. Die Aktivierung des *AMH*-Promotors sowie die Proteinexpression und –stabilität werden durch den Polymorphismus nicht verändert [79,131]. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden vier 46,XY DSD-Patienten mit gleichzeitigem Vorliegen einer *NR5A1*-Mutation sowie des Gly146Ala-Polymorphismus beschrieben. Diese Patienten zeigten entweder komplett weibliche Genitalien mit oder ohne Virilisierung in der Pubertät oder einen vornehmlich weiblichen Phänotyp mit einer Klitoromegalie. In zwei Fällen waren Müller-Strukturen vorhanden [11,51,83,132]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Patientin untersucht, bei der sowohl eine *NR5A1*-Mutation (c.689T>G) als auch ein homozygoter p.G146A-Polymorphismus nachgewiesen wurden. Diese Patientin wies ebenfalls einen schwerer wiegenden Phänotyp mit weiblichen externen Genitalien auf, wobei es während der Pubertät zur Virilisierung kam. Müller-Strukturen waren nicht vorhanden. Diese Ergebnisse unterstützen die These anderer Arbeitsgruppen. Allerdings wären größere Fallzahlen wünschenswert, um eine genaue Korrelation zu bestätigen. Zudem muss in Betracht gezogen werden, dass viele *NR5A1*-Mutationen bei Betroffenen mit einem ebenso schweren Phänotyp beschrieben wurden, welche keinen Polymorphismus aufweisen. Der Polymorphismus kann also möglicherweise zu einer starken Reduktion der Virilisierung beitragen. Es muss aber ebenso andere Faktoren geben, die den Phänotyp in gleichem Maße beeinflussen können.

4.3.2. Fehlende Korrelation zwischen AMH-Werten und Müller-Gangs-Regression als Merkmal von *NR5A1*-Mutationen

Eine weitere Auffälligkeit bei einigen Betroffenen mit *NR5A1*-Mutationen ist die Unstimmigkeit zwischen postnatalen AMH-Werten und dem Vorhandensein von Müller-Strukturen. Nur bei der Patientin 4b aus dieser Arbeit ließen sich Müller-Strukturen nachweisen, wobei passend dazu erniedrigte AMH- beziehungsweise, als weiterer Marker der Sertoli-Zellfunktion, Inhibin B-Werte gemessen wurden. Zudem konnten bei ihrem Bruder (Patient 4a) übereinstimmend mit kurz nach der Geburt gemessenen normwertigen

gen Inhibin B-Konzentrationen keine Müller-Strukturen identifiziert werden.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Patienten 2 und 5 (p.T40P und p.L230R) trotz zu niedriger AMH-Werte keine Müller-Strukturen, wobei AMH mit 12 bzw. 14 Jahren bestimmt wurde. Werte aus der Neugeborenenperiode liegen nicht vor.

Diese Diskrepanz wurde auch von anderen Autoren dargestellt, wobei AMH sowohl postnatal als auch zu Beginn der Pubertät nicht detektierbar war [81,110]. Coutant et al. beschrieben zwei Geschwister mit der gleichen *NR5A1*-Mutation ohne Müller-Strukturen, wobei das ältere Kind postnatal normwertige AMH-Konzentrationen aufwies, bei dem jüngeren Kind dagegen der AMH-Wert zu niedrig war [22]. Diese Variabilität sowie die Unstimmigkeit zwischen AMH-Werten und Aufrechterhaltung der Müller-Strukturen scheinen typisch zu sein für Mutationen im *NR5A1*-Gen. Jedoch sind Müller-Strukturen gerade bei Säuglingen nicht immer sonographisch darstellbar und werden gelegentlich auch erst im Rahmen einer Laparoskopie identifiziert [67], sodass man bei der Interpretation vorsichtig sein muss. Bei den hier untersuchten Patienten 2 und 5 wurde jedoch jeweils eine Laparoskopie durchgeführt, sodass diese Ergebnisse verwertbar sind. Im Laufe der Embryonalentwicklung kann AMH nur während einer kurzen Zeit zwischen der 6. und 9. Gestationswoche auf die Müller-Gänge wirken, danach werden sie unempfindlich gegenüber AMH [82,105]. Genau in dieser Zeit musste bei den Patienten mit Müller-Gangs-Regression also genug AMH produziert worden sein. Wie verschiedene Autoren beschrieben haben, wird SF-1 genau zu der Zeit ebenfalls in den Sertoli-Zellen exprimiert und ist notwendig für die Aktivierung des *AMH*-Promotors [25,33,54,93]. Diese These wird unterstützt durch die häufig erniedrigten AMH-Werte bei Patienten mit Mutationen im *NR5A1*-Gen [18,81,111].

Allerdings wurde postuliert, dass zumindest im Mausmodell die korrekte Bindung von SF-1 an den proximalen *Amh*-Promotor im Gegensatz zur Anwesenheit von SOX-9 nur zur vollständigen Aktivierung der Transkription notwendig ist, nicht jedoch für die Regression der Müller-Gänge. Auch bei homozygot mutierten proximalen SF-1-Bindungsstellen und daraus resultierenden sehr niedrigen AMH-Konzentrationen wurden die Müller-Strukturen vollständig abgebaut [4]. Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass SF-1 ebenfalls an eine weiter distal gelegene Sequenz im *Amh*-Promotor bindet, wodurch die Transaktivierung auch beeinflusst wird [124]. Die im Mausmodell ermittelten Ergebnisse sind natürlich nicht uneingeschränkt auf den menschlichen Körper übertragbar. Trotzdem ist es denkbar, dass die Ursache der variablen Ausprägung der Müller-Gänge zum einen eben genau darin liegt, dass durch die Mutationen die Bindung an lediglich eine oder an beide Sequenzen im Promotor gestört wird, woraus unterschiedliche AMH-Konzentrationen resultieren und so nur bei einem Teil der Patienten die Müller-Gänge abgebaut werden.

Zum anderen wurden weitere Transkriptionsfaktoren beschrieben, welche die Aktivität von

SF-1 am *AMH*-Promotor beeinflussen. SOX-9 kann ebenfalls an eine Sequenz im *AMH*-Promotor binden und wird benötigt für die Initiierung der Transkription. Durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit der C-terminalen Region von SF-1 wird die Aktivierung des Promotors verstärkt [24]. Gerade Mutationen in der Ligandenbindungsdomäne könnten diese Wechselwirkung stören. Im Gegensatz dazu wird die gemeinsame Aktivierung des *AMH*-Promotors durch Interaktion von SF-1 und GATA4 über die Bindung der DBD von SF-1 an den *AMH*-Promotor vermittelt [113]. Auch die synergistische Wirkung von WT-1 und SF-1 auf den Promotor scheint über die N-terminale Region von SF-1 zu erfolgen [74]. Über Beeinträchtigung dieser Interaktionen könnten Mutationen, die in der DNA-Bindungsdomäne liegen, die Wirkung von SF-1 reduzieren.

Die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren können als Erklärungsansatz für die variable Regression von Müller-Strukturen dienen. Dadurch wird jedoch auch die Komplexität der Mechanismen der Geschlechtsentwicklung unterstrichen und verdeutlicht, dass weitere Studien zur Klärung der Abläufe durchgeführt werden sollten. Gerade die intrafamiliäre Variabilität bezüglich der Müller-Gangs-Regression lässt sich dadurch nicht ausreichend erklären.

4.3.3. Variable pränatale Virilisierung und spontane Pubertätsentwicklung

SF-1-Mutationen führen aber nicht nur zu einer Sertoli-Zell-Dysfunktion, sondern beeinträchtigen auch die Testosteronsynthese in den Leydig-Zellen. Dies hat bei den in dieser Arbeit beschriebenen Patientinnen und Patienten zu einer unterschiedlich starken Reduktion der Virilisierung geführt. Der Patient 4a (p.Y211TfsX83) wies mit einer skrotalen Hypospadie, einer reduzierten Penislänge und einem Scrotum bipartitum den höchsten Virilisierungsgrad auf. Die Patienten 1 und 2 (p.D18_G22del und p.T40P) fielen bei Geburt jeweils mit einem Mikropenis auf. Die am schwersten wiegende Form der Untervirilisierung mit vollständig weiblichen externen Genitalien zeigten die Patientinnen 3, 4b und 5 (p.V128CfsX168, p.Y211TfsX83, p.L230R), jedoch ist bei Patientin 3 nichts über den Phänotyp bei der Geburt bekannt. Auch andere Autoren berichten von einer großen Variabilität der Virilisierung bei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen, wobei das Spektrum von männlicher Infertilität über Hypospadie bis hin zu komplett weiblichen externen Genitalien reicht [3,9,22,31,62,132], wodurch die Diagnosestellung erschwert ist. Interessanterweise kam es bei Patientin 5 (p.L230R) mit weiblichen externen Genitalien und fehlenden Müller-Strukturen in der Pubertät zu einer spontanen Virilisierung, die sich in einer Klitorishypertrophie und einem Hirsutismus ausdrückte. Der hCG-Test ergab eine gute Stimulierbarkeit von Testosteron, DHT und Androstendion. Inhibin B und AMH waren

erniedrigt. Diese Konstellation spricht für eine progrediente Dysfunktion der Sertoli-Zellen bei gleichzeitig guter Funktion der adulten Leydig-Zellen, wobei die fetalen Leydig-Zellen anscheinend nicht ausreichend funktionsfähig waren. SF-1 muss demnach in den beiden Zelltypen unterschiedlich wichtige Rollen während der Geschlechtsentwicklung spielen und auch zu verschiedenen Zeitpunkten wirksam werden.

Nachdem zunächst vor allem *NR5A1*-Mutationen bei Patienten beschrieben wurden, bei denen die Gonaden frühzeitig entfernt wurden [62] oder bei denen auch ohne Gona- dektomie die Testosteronkonzentration in der Pubertät erniedrigt war [40], wurden in den letzten Jahren einige bei Geburt stark untervirilisierte Patienten mit spontaner Pubertäts- entwicklung und normalen Testosteronwerten in der Pubertät entsprechend der hier analysierten Patientin 5 beschrieben. Die *NR5A1*-Mutation p.R281P wurde bei einem Patienten nachgewiesen, der eine stark verminderte Virilisierung und subnormale Testosteronwerte bei Geburt sowie einen spontanen Pubertätsbeginn mit normwertigem Testosteron zeigte. Auch dieser Patient wies keine Müller-Strukturen auf, in der Pubertät wurden jedoch zu niedrige Inhibinkonzentrationen gemessen [80]. Cools et al. beschrie- ben ebenfalls zwei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen, die eine verminderte Virilisierung bei Geburt, aber eine spontane Pubertätsentwicklung zeigten. Testosteron lag jeweils im Normbereich, wobei die AMH-Konzentrationen zu niedrig waren [20]. Diese Fallbeschrei- bungen unterstützen die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit, dass Mutationen im *NR5A1*-Gen einerseits zu einer progredienten Sertoli-Zell-Dysfunktion im Laufe der Entwicklung führen können, andererseits eine ausreichende Testosteronproduktion in der Pubertät trotz mangelnder Virilisierung während der Embryonalentwicklung möglich ist.

Dazu wurde die Vermutung aufgestellt, dass SF-1 in fetalen Leydig-Zellen stärker zur Testosteronsynthese benötigt werden könnte als in adulten [99]. Dies ließe sich erklären durch die unterschiedliche Regulation der Steroidbiosynthese in den verschiedenen Leydig-Zellpopulationen, den fetalen, infantilen und adulten Leydig-Zellen. Bis zur siebten Schwangerschaftswoche scheint LH nicht an der Entwicklung der Leydig-Zellen und der Testosteronproduktion beteiligt zu sein. Danach ist LH entscheidend für die Aufrechterhal- tung und Funktion der Leydig-Zellen [103]. Möglicherweise spielt SF-1 daher eine wichtigere Rolle bei der Testosteronproduktion in den fetalen als in den adulten Leydig- Zellen, da in letzteren die Steroidbiosynthese auch durch LH stimuliert werden kann.

Wie ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Mutationen lagen auch die hier untersuchten Mutationen heterozygot vor. Es existiert also jeweils noch ein funktionsfähi- ges Allel, das für die Virilisierung ursächlich sein könnte. Gegen diese Hypothese spricht zwar der Bericht von Lourenco et al., in dem eine Patientin beschrieben wird mit weiblichen externen Genitalien, die sich mit 18 Jahren aufgrund einer primären Amenorrhoe und Zeichen der Virilisierung vorstellte, wobei das Testosteron vermindert

war [64]. Die Patientin war homozygot für die *NR5A1*-Mutation c.877G>A. Die SF-1-Aktivität ist durch diese Mutation jedoch weniger eingeschränkt als durch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutationen, da sie noch eine partielle Restaktivität am *Cyp11A1*- und *Cyp19A1*-Promotor zeigt. Zudem ist dies ein Einzelfall und die Testosteronkonzentration lag nicht im Normbereich wie bei der Patientin 5. Es wäre demnach trotzdem möglich, dass das verbleibende Allel bei heterozygoten Patienten für die Testosteronproduktion verantwortlich ist.

Obwohl viele Details hinsichtlich dieser Frage bislang ungeklärt sind, ist vor allem von Bedeutung, das Wissen um die mögliche pubertäre Virilisierung bei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen in die Entscheidungsfindung zur Geschlechtszuordnung einzubeziehen.

Weiterhin muss aber auch ein möglicherweise später auftretender Verlust der Gonadenfunktion bei der Behandlung von 46,XY DSD-Patienten bedacht werden. Tantawy et al. beschrieben einen Patienten mit Hypospadie und Mikropenis bei Geburt, der zunächst eine spontane Pubertätsentwicklung mit normwertigem Testosteron aufwies. Im Verlauf kam es allerdings zu einem Rückgang der Leydig-Zellfunktion, sodass mit 28 Jahren eine Testosteronsubstitution notwendig wurde [110]. Die Autoren empfehlen daher, auch im Hinblick auf die durch *NR5A1*-Mutationen verursachte mögliche männliche Infertilität [31], eine frühe Kryokonservierung von in der Pubertät vorhandenen Spermien in Betracht zu ziehen [110]. Einen ähnlichen Phänotyp mit ebenfalls spontaner Pubertät wies der in dieser Arbeit untersuchte Patient 4a auf. Auch hier sollte eine Kryokonservierung diskutiert werden, sofern Spermien vorhanden sind. Bislang lehnte der Patient eine Spermienanalyse jedoch ab.

4.3.4. Bedeutung der Gonadenhistologie für den Virilisierungsgrad

Eine weitere Schwierigkeit in der Betreuung von Patientinnen und Patienten mit *NR5A1*-Mutationen ist das variable histologische Bild der Gonaden. Als typische Histologie bei *NR5A1*-Mutationen wurde ein Bild aus hypoplastischen Tubuli seminiferi, Leydig-Zellen mit zytoplasmatischen Lipidansammlungen, normaler Anzahl an Sertoli-Zellen mit runden oder ovalen pyknotischen Kernen und unauffälligem Zytoplasma sowie einer reduzierten Spermatogonienanzahl beschrieben. Diese Patienten wiesen meistens ambivalente Genitalien auf, einige jedoch auch komplett weibliche externe Genitalien. Müller-Strukturen konnten bei den meisten Patienten nicht detektiert werden [75]. Eine ähnliche Histologie konnte auch bei Patientin 4b (p.Y211TfsX83) aus dieser Arbeit nachgewiesen werden, wobei bei ihr zusätzlich Tubenanteile vorlagen. Jedoch wurden bislang auch viele Betroffene mit Mutationen im *NR5A1*-Gen beschrieben, bei denen diese Histologie nicht nachgewiesen wurde. Dabei reichte das Spektrum von lediglich fibrösem Gewebe [81]

über eine regelrechte Anordnung von Leydig- und Sertoli-Zellen mit fehlenden Keimzellen [3,110] bis hin zu einer normalen Hodenstruktur [22], wobei sich keine Korrelation zwischen einer besonders schweren Gonadendysgenese und einer stark verminderten Virilisierung bzw. einer normalen Histologie und einem leichteren Phänotyp zeigte. Dieses breite Spektrum an histologischen Varianten spiegelt sich auch bei den Patienten in der vorliegenden Arbeit wider. Während der Patient 2 (p.T40P) eine regelrechte Histologie aufweist, zeigte die Histologie der Patientin 5 (p.L230R) ein Sertoli-cell-only-Syndrom ohne Keimzellen. Diese Patientin fiel im Alter von 14 Jahren mit einer spontanen Virilisierung auf. Genau diese klinische Präsentation wurde in der Literatur ebenfalls bei einer Patientin mit einem Sertoli-cell-only-Syndrom und einer reduzierten Anzahl an Leydig-Zellen beschrieben. Nach der Gonadektomie kam es zum Abfall der Testosteronkonzentration, wodurch eine Testosteronproduktion in den stark dysgenetischen Gonaden bewiesen werden konnte [99].

Diese Ergebnisse bestätigen die Bedeutung von SF-1 bei der Gonadenentwicklung, die durch *NR5A1*-Mutationen schwerwiegend gestört werden kann. Dabei bleiben bisher die Ursachen für die variable Histologie ungeklärt. Denkbar wären auch hier andere Kofaktoren, die den Einfluss von SF-1 auf die korrekte Differenzierung von Sertoli- und Leydig-Zellen modulieren. Beispielsweise wird die Entwicklung der Sertoli-Zellen durch die Hochregulation des Transkriptionsfaktors SRY gesteuert, welcher wiederum den Transkriptionsfaktor SOX-9 aktiviert, der schließlich zur Differenzierung der Vorläuferzellen in Richtung Sertoli-Zellen führt [72,90]. Dieser Vorgang wird ebenfalls durch SF-1 reguliert, der gemeinsam mit SRY die Transkription von SOX9 initiiert [91]. Auch die Differenzierung der Leydig-Zellen wird durch die Kooperation von SF-1 mit anderen Faktoren gesteuert, wie beispielsweise dem Desert hedgehog (DHH)-Protein. Dieses wird in den Sertoli-Zellen produziert und spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Leydig-Zellen [13]. Im Gegensatz zu lediglich für das *NR5A1*-Gen heterozygoten *Knockout*-Mäusen, die eine regelrechte Geschlechtsentwicklung aufweisen, führt die Kombination von SF-1 +/-; DHH-/- – *Knockout*-Mäusen zu einer stärkeren Einschränkung der Leydig-Zell-Differenzierung und damit der Virilisierung [77]. Dies bestätigt die Bedeutung der Interaktion von SF-1 mit Kofaktoren bei der Differenzierung der Gonaden. Es ist also durchaus denkbar, dass eine Störung dieser Interaktionen durch die verschiedenen Mutationen für die variable Entwicklung der Gonaden verantwortlich sein könnte.

Vor dem Hintergrund dieser Diskussion und der vielen noch offenen Fragen sollten im Einzelfall sowohl die Entscheidung zur Gonadektomie als auch die Geschlechtszuordnung sorgfältig überdacht werden. Auch bei schwer dysgenetischen Gonaden kann es zu einer

ausreichenden Testosteronproduktion mit spontaner Pubertätsentwicklung kommen, wie auch die Patientin aus dieser Arbeit gezeigt hat.

4.4. Tendenz zur malignen Entartung bei Gonadendysgenese durch *NR5A1*-Mutationen

Unklar ist bislang auch, wie hoch die Tendenz der dysgenetischen Gonaden bei Patientinnen und Patienten mit *NR5A1*-Mutationen ist, im Laufe der Zeit maligne zu entarten. Das Risiko, einen Keimzelltumor zu entwickeln, liegt bei einer Gonadendysgenese generell zwischen 15-35 %, sodass eine Gonadektomie empfohlen wird. Spezielle Daten für Patienten mit Mutationen im *NR5A1*-Gen liegen allerdings nicht vor [19,56]. Laut Gabriel Ribeiro de Andrade et al. können die Gonaden zumindest bis zum Ende der Pubertät in den Labioskrotalfalten verbleiben. Die Arbeitsgruppe beschrieb zwei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen nach der Pubertät, die keine Entartung aufwiesen und eine gute Testosteronproduktion zeigten [32]. Auch bei den Patienten der vorliegenden Arbeit, bei denen histologische Untersuchungen verfügbar waren, gab es keine Hinweise auf Malignität. Dabei wurde eine Biopsie im Säuglingsalter aus inguinal lokalisierten Hoden gewonnen, eine mit 14 Jahren ebenfalls aus inguinalen Hoden und eine Histologie mit 15 Jahren aus abdominalen Hoden. Auch bei den meisten anderen beschriebenen Patienten mit *NR5A1*-Mutationen wurden keine Keimzelltumore nachgewiesen. Allerdings wurde ein 13-jähriger Patient mit normalen Testosteronwerten und spontanem Eintritt in die Pubertät beschrieben, der in den inguinal und abdominal gelegenen Hoden Merkmale eines Carcinoma in situ zeigte. Dabei war die Hodenstruktur sonst nur leicht dysgenetisch [20]. Keimzelltumore scheinen also bei *NR5A1*-Mutationen nicht häufig vorzukommen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich solche Neoplasien entwickeln, wobei auch hier noch keine Aussage über eine Korrelation zwischen dem Grad der Dysgenese und der Wahrscheinlichkeit einer Entartung getroffen werden kann. Daher sollte gerade in Anbetracht der zuvor beschriebenen möglichen Testosteronproduktion selbst in dysgenetischen Gonaden die Entscheidung zur Gonadektomie individuell gestellt werden und bei Verbleib der Gonaden *in situ* regelmäßige Kontrollen erfolgen.

4.5. Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der *in vitro*-Analysen zwar nicht uneingeschränkt auf die Verhältnisse *in vivo* übertragbar sind, die fünf untersuchten Mutationen jedoch trotzdem gut hinsichtlich ihrer Funktionalität charakterisiert werden

konnten und mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich für den entsprechenden Phänotyp sind. Auch hinsichtlich der Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnten gewisse Erkenntnisse gewonnen werden. Allerdings bleiben viele Details immer noch ungeklärt, besonders im Hinblick auf die große phänotypische Variabilität bei Mutationen im *NR5A1*-Gen. Diese führt auch dazu, dass es einige Überschneidungen der klinischen Ausprägung bei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen und anderen Ursachen für Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung gibt, was oft Ursache einer verzögerten Diagnosestellung ist. Gerade bei stark vermindert virilisierten Patienten ohne Müller-Strukturen wird oft fälschlicherweise nicht an eine partielle Gonadendysgenese gedacht, sondern eine partielle Androgenresistenz (PAIS) als Ursache angenommen. Im Gegensatz zum PAIS können jedoch laut Coutant et al. bei einigen Patienten mit *NR5A1*-Mutationen erhöhte FSH-Werte gemessen werden als Hinweis auf eine Sertoli-Zelldysfunktion und damit auf eine Gonadendysgenese [22]. Auch alle in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen und Patienten wiesen entweder bei Geburt oder im Laufe des späteren Lebens erhöhte FSH-Werte auf (siehe Anhang). Dies könnte in Zukunft als Hinweis auf eine *NR5A1*-Mutation dienen und damit zu einer schnelleren Diagnosestellung führen.

Auch bei der in der Pubertät auftretenden Virilisierung bei Patientinnen mit bis dahin komplett weiblichem Genitale werden Mutationen im *NR5A1*-Gen häufig nicht als Ursache in die Überlegungen einbezogen. Wie auch Siklar et al. zusammenfassend beschreiben, ist eine Virilisierung in der Pubertät bislang vor allem bekannt bei 46,XY DSD-Patienten mit intakter Gonadenstruktur sowie einem PAIS, einem 5 α -Reduktase-Mangel oder einem 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-3-Mangel [99]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen jedoch, dass *NR5A1*-Mutationen gerade bei Betroffenen mit spontaner Virilisierung und dysgenetischen Gonaden ebenfalls eine Ursache darstellen können.

Vor dem Hintergrund der bislang noch weitestgehend ungeklärten Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp, des breiten klinischen Spektrums bei *NR5A1*-Mutationen und der nicht seltenen Diagnose einer Mutation im *NR5A1*-Gen bei zunächst anderen vermuteten Ursachen des DSD-Phänotyps sollte in Betracht gezogen werden, in Zukunft gerade bei uneindeutigen klinischen Präsentationen routinemäßig nach Mutationen im *NR5A1*-Gen zu suchen. Auch eine Umformulierung der DSD-Klassifikation, die stärker auf die genetischen Ursachen eingeht, sollte diskutiert werden. Dabei könnte besonders die Aufhebung der strikten klinischen Trennung zwischen Gonadendysgenese und Defekten der Androgensynthese oder –wirkung zu einer erleichterten Diagnosestellung führen [126].

5. Zusammenfassung

Durch Mutationen in bestimmten Genen kann es während der Embryonalentwicklung zu Diskrepanzen zwischen dem chromosomalen, dem gonadalen und dem phänotypischen Geschlecht kommen. Diese werden zusammenfassend als ‚Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung‘ bzw. als ‚*Differences of sex development*‘ (DSD) bezeichnet. Aufgrund der genetischen Heterogenität kann nicht immer eine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Zuordnung getroffen werden. Eine mögliche Ursache von DSD sind Mutationen im *NR5A1*-Gen, welches für den Steroidogenic Factor-1 kodiert. Dieser reguliert u.a. verschiedene Schritte der Geschlechtsentwicklung. Mutationen im *NR5A1*-Gen konnten bei Betroffenen mit 46,XY- und 46,XX-Karyotyp und einem breiten phänotypischen Spektrum an Besonderheiten in der Geschlechtsentwicklung nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollten fünf bisher nicht beschriebene Mutationen im *NR5A1*-Gen, die bei Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen DSD-Ausprägungen identifiziert werden konnten, funktionell hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Proteinexpression, die Transaktivierungsaktivität sowie auf die DNA-Bindungsaktivität von SF-1 untersucht werden. Dazu wurden Western Blots, Luciferase-Assays und Electrophoretic Mobility Shift Assays durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass jede der fünf Mutationen zu einer deutlichen Reduktion der Transaktivierungsaktivität von SF-1 an verschiedenen Zielgenen führt, wobei die Proteinakkumulation außer bei den *frameshift*-Mutationen nicht eingeschränkt war. Die in der DNA-Bindungsdomäne gelegene Punktmutation p.T40P und die *inframe*-Deletion p.D18_G22del führten zu einem vollständigen, die in der Liganden-Bindungsdomäne liegende Punktmutation p.L230R zu einem teilweisen Verlust der DNA-Bindungsaktivität von SF-1.

Insgesamt konnten die verschiedenen Mutationen gut hinsichtlich ihrer Funktionalität charakterisiert werden und scheinen für die verschiedenen Phänotypen verantwortlich zu sein. Jedoch lassen sich die *in vitro* ermittelten Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen, weil unter anderem mögliche Kofaktoren oder die Kombination mit weiteren Mutationen nicht ausreichend untersucht wurden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es bei Patienten mit *NR5A1*-Mutationen keine eindeutige Korrelation zwischen dem Genotyp, den endokrinologischen Laborparametern, der Gonadenhistologie und der Virilisierung gibt. Daher sollten Mutationen im *NR5A1*-Gen in Zukunft vor allem bei klinisch nicht eindeutiger Präsentation als Ursache von DSD in Betracht gezogen werden. Es sind dennoch weitere Studien zur genaueren Charakterisierung von *NR5A1*-Mutationen notwendig, um so die medizinische Versorgung der betroffenen Patientinnen und Patienten verbessern zu können.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Achermann J.C., Ito M., Ito M., Hindmarsh P.C., Jameson J.L. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat. Genet.* 1999; 22: S. 125–6.
- [2] Achermann J.C., Ozisik G., Ito M., Orun U.A., Harmanci K., Gurakan B., Jameson J.L. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002; 87: S. 1829–33.
- [3] Allali S., Muller J.-B., Brauner R., Lourenço D., Boudjenah R., Karageorgou V., Trivin C., Lottmann H., Lortat-Jacob S., Nihoul-Fékété C., De Dreuzy O., McElreavey K., Bashamboo A. Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PLOS ONE.* 2011; 6: S. e24117.
- [4] Arango N.A., Lovell-Badge R., Behringer R.R. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell.* 1999; 99: S. 409–19.
- [5] Asa S.L., Bamberger A.M., Cao B., Wong M., Parker K.L., Ezzat S. The transcription activator steroidogenic factor-1 is preferentially expressed in the human pituitary gonadotroph. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81: S. 2165–70.
- [6] Baetens D., Mladenov W., Delle Chiaie B., Menten B., Desloovere A., Iotova V., Callewaert B., Van Laecke E., Hoebeke P., De Baere E., Cools M. Extensive clinical, hormonal and genetic screening in a large consecutive series of 46,XY neonates and infants with atypical sexual development. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2014; 9: S. 209.
- [7] Baetens D., Stoop H., Peelman F., Todeschini A.-L., Rosseel T., Coppieters F., Veitia R.A., Looijenga L.H.J., De Baere E., Cools M. NR5A1 is a novel disease gene for 46,XX testicular and ovotesticular disorders of sex development. *Genetics in Medicine.* 2016; : S. 1–10.
- [8] Bashamboo A., Donohoue P.A., Vilain E., Rojo S., Calvel P., Seneviratne S.N., Buonocore F., Barseghyan H., Bingham N., Rosenfeld J.A., Mulukutla S.N., Jain M., Burrage L., Dhar S., Balasubramanyam A., Lee B., Members of UDN, Dumargne M.-C., Eozenou C., Suntharalingham J.P., de Silva K., Lin L., Bignon-Topalovic J., Poulat F., Lagos C.F., McElreavey K., Achermann J.C. A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25: S. 3446–53.
- [9] Bashamboo A., Ferraz-de-Souza B., Lourenço D., Lin L., Sebire N.J., Montjean D., Bignon-Topalovic J., Mandelbaum J., Siffroi J.-P., Christin-Maitre S., Radhakrishna U., Rouba H., Ravel C., Seeler J., Achermann J.C., McElreavey K. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *Am. J. Hum. Genet.* 2010; 87: S. 505–12.
- [10] Baxter R.M., Arboleda V.A., Lee H., Barseghyan H., Adam M.P., Fechner P.Y., Bargman R., Keegan C., Travers S., Schelley S., Hudgins L., Mathew R.P., Stalker H.J., Zori R., Gordon O.K., Ramos-Platt L., Pawlikowska-Haddal A., Eskin A., Nel-

- son S.F., Délot E., Vilain E. Exome sequencing for the diagnosis of 46,XY disorders of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100: S. E333-344.
- [11] Bertelloni S., Dati E., Baldinotti F., Toschi B., Marrocco G., Sessa M.R., Michelucci A., Simi P., Baroncelli G.I. NR5A1 gene mutations: clinical, endocrine and genetic features in two girls with 46,XY disorder of sex development. *Horm Res Paediatr.* 2014; 81: S. 104–8.
- [12] Biason-Lauber A., Schoenle E.J. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 67: S. 1563–8.
- [13] Bitgood M.J., Shen L., McMahon A.P. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 1996; 6: S. 298–304.
- [14] Brinkmann L., Schweizer K., Richter-Appelt H. Behandlungserfahrungen von Menschen mit Intersexualität. *Gynäkologische Endokrinologie.* 2007; 5: S. 235–42.
- [15] Camats N., Pandey A.V., Fernández-Cancio M., Andaluz P., Janner M., Torán N., Moreno F., Bereket A., Akcay T., García-García E., Muñoz M.T., Gracia R., Nistal M., Castaño L., Mullis P.E., Carrascosa A., Audí L., Flück C.E. Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012; 97: S. E1294-1306.
- [16] Campbell L.A., Faivre E.J., Show M.D., Ingraham J.G., Flinders J., Gross J.D., Ingraham H.A. Decreased recognition of SUMO-sensitive target genes following modification of SF-1 (NR5A1). *Mol. Cell. Biol.* 2008; 28: S. 7476–86.
- [17] Chang Y.-F., Imam J.S., Wilkinson M.F. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 2007; 76: S. 51–74.
- [18] Ciaccio M., Costanzo M., Guercio G., De Dona V., Marino R., Ramirez P.C., Galeano J., Warman D.M., Berensztein E., Saraco N., Baquedano M.S., Chaler E., Maceiras M., Lazzatti J.M., Rivarola M.A., Belgorosky A. Preserved fertility in a patient with a 46,XY disorder of sex development due to a new heterozygous mutation in the NR5A1/SF-1 gene: evidence of 46,XY and 46,XX gonadal dysgenesis phenotype variability in multiple members of an affected kindred. *Horm Res Paediatr.* 2012; 78: S. 119–26.
- [19] Cools M., Drop S.L.S., Wolffenbuttel K.P., Oosterhuis J.W., Looijenga L.H.J. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr. Rev.* 2006; 27: S. 468–84.
- [20] Cools M., Hoebeke P., Wolffenbuttel K.P., Stoop H., Hersmus R., Barbaro M., Wedell A., Brüggewirth H., Looijenga L.H.J., Drop S.L.S. Pubertal androgenization and gonadal histology in two 46,XY adolescents with NR5A1 mutations and predominantly female phenotype at birth. *Eur. J. Endocrinol.* 2012; 166: S. 341–9.
- [21] Correa R.V., Domenice S., Bingham N.C., Billerbeck A.E.C., Rainey W.E., Parker K.L., Mendonca B.B. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: S. 1767–72.
- [22] Coutant R., Mallet D., Lahlou N., Bouhours-Nouet N., Guichet A., Coupris L., Croué A., Morel Y. Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: S. 2868–73.

- [23] Crawford P.A., Polish J.A., Ganpule G., Sadovsky Y. The activation function-2 hexamer of steroidogenic factor-1 is required, but not sufficient for potentiation by SRC-1. *Mol. Endocrinol.* 1997; 11: S. 1626–35.
- [24] De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F., Berta P. Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18: S. 6653–65.
- [25] De Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F., Berta P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev. Dyn.* 2000; 217: S. 293–8.
- [26] Desclozeaux M., Krylova I.N., Horn F., Fletterick R.J., Ingraham H.A. Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 2002; 22: S. 7193–203.
- [27] Dietz H.C., McIntosh I., Sakai L.Y., Corson G.M., Chalberg S.C., Pyeritz R.E., Francomano C.A. Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics.* 1993; 17: S. 468–75.
- [28] Douglas N.C., Heng K., Sauer M.V., Papaioannou V.E. Dynamic expression of Tbx2 subfamily genes in development of the mouse reproductive system. *Dev. Dyn.* 2012; 241: S. 365–75.
- [29] Eggers S., Smith K.R., Bahlo M., Looijenga L.H.J., Drop S.L.S., Juniarto Z.A., Harley V.R., Koopman P., Faradz S.M.H., Sinclair A.H. Whole exome sequencing combined with linkage analysis identifies a novel 3 bp deletion in NR5A1. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015; 23: S. 486–93.
- [30] Fabbri H.C., de Andrade J.G.R., Soardi F.C., de Calais F.L., Petroli R.J., Maciel-Guerra A.T., Guerra-Júnior G., de Mello M.P. The novel p.Cys65Tyr mutation in NR5A1 gene in three 46,XY siblings with normal testosterone levels and their mother with primary ovarian insufficiency. *BMC Medical Genetics.* 2014; 15: S. 7.
- [31] Ferlin A., Rocca M.S., Vinanzi C., Ghezzi M., Di Nisio A., Foresta C. Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. *Fertil. Steril.* 2015; 104: S. 163–169.e1.
- [32] Gabriel Ribeiro de Andrade J., Marques-de-Faria A.P., Fabbri H.C., de Mello M.P., Guerra-Júnior G., Maciel-Guerra A.T. Long-Term Follow-Up of Patients with 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Reared as Males. *International Journal of Endocrinology.* 2014; 2014: S. 480724.
- [33] Giuili G., Shen W.H., Ingraham H.A. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development.* 1997; 124: S. 1799–807.
- [34] Gobinet J., Poujol N., Sultan C. Molecular action of androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002; 198: S. 15–24.
- [35] Greer L.F., Szalay A.A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence.* 2002; 17: S. 43–74.

- [36] Groskreutz D., Schenborn E.T. Reporter systems. *Methods Mol. Biol.* 1997; 63: S. 11–30.
- [37] Hammer G.D., Krylova I., Zhang Y., Darimont B.D., Simpson K., Weigel N.L., Ingraham H.A. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Molecular Cell.* 1999; 3: S. 521–6.
- [38] Hanley N.A., Ball S.G., Clement-Jones M., Hagan D.M., Strachan T., Lindsay S., Robson S., Ostrer H., Parker K.L., Wilson D.I. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* 1999; 87: S. 175–80.
- [39] Hanley N.A., Hagan D.M., Clement-Jones M., Ball S.G., Strachan T., Salas-Cortés L., McElreavey K., Lindsay S., Robson S., Bullen P., Ostrer H., Wilson D.I. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 2000; 91: S. 403–7.
- [40] Hasegawa T., Fukami M., Sato N., Katsumata N., Sasaki G., Fukutani K., Morohashi K.-I., Ogata T. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: S. 5930–5.
- [41] Holterhus P.-M. Störungen der Geschlechtsentwicklung, in: Hiort O., Danne T., Wabitsch M. (Hrsg.): *Pädiatrische Endokrinologie und Diabetologie.* S. 392-409, hier S. 395-404. Springer, Berlin Heidelberg; 2010.
- [42] Igarashi M., Takasawa K., Hakoda A., Kanno J., Takada S., Miyado M., Baba T., Morohashi K.-I., Tajima T., Hata K., Nakabayashi K., Matsubara Y., Sekido R., Ogata T., Kashimada K., Fukami M. Identical NR5A1 Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Hum. Mutat.* 2017; 38: S. 39–42.
- [43] Ingraham H.A., Lala D.S., Ikeda Y., Luo X., Shen W.H., Nachtigal M.W., Abbud R., Nilson J.H., Parker K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev.* 1994; 8: S. 2302–12.
- [44] Ito M., Achermann J.C., Jameson J.L. A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: S. 31708–14.
- [45] Ito M., Park Y., Weck J., Mayo K.E., Jameson J.L. Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol. Endocrinol.* 2000; 14: S. 66–81.
- [46] Ito M., Yu R.N., Jameson J.L. Steroidogenic factor-1 contains a carboxy-terminal transcriptional activation domain that interacts with steroid receptor coactivator-1. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: S. 290–301.
- [47] Jacob A.L., Lund J. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: S. 13391–4.
- [48] Jacob A.L., Lund J., Martinez P., Hedin L. Acetylation of steroidogenic factor 1 protein regulates its transcriptional activity and recruits the coactivator GCN5. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: S. 37659–64.

- [49] Ji S.-Y., Hao J.-X., Li L., Zhang J., Zheng Q.-S., Li X.-X., Wang X.-N., Han C.-S., Gao F., Liu Y.-X. Expression of inhibin- α is regulated synergistically by Wilms' tumor gene 1 (Wt1) and steroidogenic factor-1 (Sf1) in sertoli cells. *PLOS ONE*. 2013; 8: S. e53140.
- [50] Karam R., Wengrod J., Gardner L.B., Wilkinson M.F. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: implications for physiology and disease. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1829: S. 624–33.
- [51] Köhler B., Lin L., Ferraz-de-Souza B., Wieacker P., Heidemann P., Schröder V., Biebermann H., Schnabel D., Grüters A., Achermann J.C. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Hum. Mutat.* 2008; 29: S. 59–64.
- [52] Köhler B., Lin L., Mazen I., Cetindag C., Biebermann H., Akkurt I., Rossi R., Hiort O., Grüters A., Achermann J.C. The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 2009; 161: S. 237–42.
- [53] Krylova I.N., Sablin E.P., Moore J., Xu R.X., Waitt G.M., MacKay J.A., Juzumiene D., Bynum J.M., Madauss K., Montana V., Lebedeva L., Suzawa M., Williams J.D., Williams S.P., Guy R.K., Thornton J.W., Fletterick R.J., Willson T.M., Ingraham H.A. Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell*. 2005; 120: S. 343–55.
- [54] Lasala C., Schteingart H.F., Arouche N., Bedecarrás P., Grinspon R.P., Picard J.-Y., Josso N., di Clemente N., Rey R.A. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011; 301: S. E539–547.
- [55] Lee M.B., Lebedeva L.A., Suzawa M., Wadekar S.A., Desclozeaux M., Ingraham H.A. The DEAD-box protein DP103 (Ddx20 or Gemin-3) represses orphan nuclear receptor activity via SUMO modification. *Mol. Cell. Biol.* 2005; 25: S. 1879–90.
- [56] Lee P.A., Houk C.P., Ahmed S.F., Hughes I.A., International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Paediatric Endocrinology. Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics*. 2006; 118: S. e488–500.
- [57] Leers-Sucheta S., Morohashi K., Mason J.I., Melner M.H. Synergistic activation of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: S. 7960–7.
- [58] Lewis A.E., Rusten M., Hoivik E.A., Vikse E.L., Hansson M.L., Wallberg A.E., Bakke M. Phosphorylation of steroidogenic factor 1 is mediated by cyclin-dependent kinase 7. *Mol. Endocrinol.* 2008; 22: S. 91–104.
- [59] Li L.A., Chiang E.F., Chen J.C., Hsu N.C., Chen Y.J., Chung B.C. Function of steroidogenic factor 1 domains in nuclear localization, transactivation, and interaction with transcription factor TFIIB and c-Jun. *Mol. Endocrinol.* 1999; 13: S. 1588–98.

- [60] Li Y., Choi M., Cavey G., Daugherty J., Suino K., Kovach A., Bingham N.C., Klierer S.A., Xu H.E. Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. *Mol. Cell.* 2005; 17: S. 491–502.
- [61] Lim H.N., Freestone S.H., Romero D., Kwok C., Hughes I.A., Hawkins J.R. Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: mutation analysis of SRY, SRY-related genes and FTZ-F1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1998; 140: S. 51–8.
- [62] Lin L., Philibert P., Ferraz-de-Souza B., Kelberman D., Homfray T., Albanese A., Molini V., Sebire N.J., Einaudi S., Conway G.S., Hughes I.A., Jameson J.L., Sultan C., Dattani M.T., Achermann J.C. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007; 92: S. 991–9.
- [63] Little T.H., Zhang Y., Matulis C.K., Weck J., Zhang Z., Ramachandran A., Mayo K.E., Radhakrishnan I. Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: a helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: S. 831–43.
- [64] Lourenço D., Brauner R., Lin L., De Perdigo A., Weryha G., Muresan M., Boudjenah R., Guerra-Junior G., Maciel-Guerra A.T., Achermann J.C., McElreavey K., Bashamboo A. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: S. 1200–10.
- [65] Luisi B.F., Xu W.X., Otwinowski Z., Freedman L.P., Yamamoto K.R., Sigler P.B. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature.* 1991; 352: S. 497–505.
- [66] Luo Z., Wijeweera A., Oh Y., Liou Y.-C., Melamed P. Pin1 facilitates the phosphorylation-dependent ubiquitination of SF-1 to regulate gonadotropin beta-subunit gene transcription. *Mol. Cell. Biol.* 2010; 30: S. 745–63.
- [67] Mallet D., Bretones P., Michel-Calemard L., Dijoud F., David M., Morel Y. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89: S. 4829–32.
- [68] Mello M.P. de, França E.S. de S., Fabbri H.C., Maciel-Guerra A.T., Guerra-Júnior G. Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011; 55: S. 607–12.
- [69] Miyamoto Y., Taniguchi H., Hamel F., Silversides D.W., Viger R.S. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Molecular Biology.* 2008; 9: S. 44.
- [70] Mizutani T., Yazawa T., Ju Y., Imamichi Y., Uesaka M., Inaoka Y., Matsuura K., Kamiki Y., Oki M., Umezawa A., Miyamoto K. Identification of a novel distal control region upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene that participates in SF-1-dependent chromatin architecture. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: S. 28240–51.
- [71] Moore K.L., Persaud T.V.N., Torchia M.G., Viebahn C. Urogenitalsystem, in: *Embryologie: Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogese, Klinik.* S. 315–360, hier S. 336–349. Elsevier, Urban & Fischer, München; 2013.

- [72] Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.* 1996; 14: S. 62–8.
- [73] Morohashi K., Honda S., Inomata Y., Handa H., Omura T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: S. 17913–9.
- [74] Nachtigal M.W., Hirokawa Y., Enyeart-VanHouten D.L., Flanagan J.N., Hammer G.D., Ingraham H.A. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 1998; 93: S. 445–54.
- [75] Nishina-Uchida N., Fukuzawa R., Numakura C., Suwanai A.S., Hasegawa T., Hasegawa Y. Characteristic testicular histology is useful for the identification of NR5A1 gene mutations in prepubertal 46,XY patients. *Horm Res Paediatr.* 2013; 80: S. 119–28.
- [76] Oba K., Yanase T., Nomura M., Morohashi K., Takayanagi R., Nawata H. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 226: S. 261–7.
- [77] Park S.Y., Tong M., Jameson J.L. Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development. *Endocrinology.* 2007; 148: S. 3704–10.
- [78] Philibert P., Leprieur E., Zenaty D., Thibaud E., Polak M., Frances A.-M., Lespinasse J., Raingeard I., Servant N., Audran F., Paris F., Sultan C. Steroidogenic factor-1 (SF-1) gene mutation as a frequent cause of primary amenorrhea in 46,XY female adolescents with low testosterone concentration. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2010; 8: S. 28.
- [79] Philibert P., Paris F., Lakhal B., Audran F., Gaspari L., Saâd A., Christin-Maître S., Bouchard P., Sultan C. NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency. *Fertil. Steril.* 2013; 99: S. 484–9.
- [80] Philibert P., Polak M., Colmenares A., Lortat-Jacob S., Audran F., Poulat F., Sultan C. Predominant Sertoli cell deficiency in a 46,XY disorders of sex development patient with a new NR5A1/SF-1 mutation transmitted by his unaffected father. *Fertil. Steril.* 2011; 95: S. 1788.e5-9.
- [81] Philibert P., Zenaty D., Lin L., Soskin S., Audran F., Léger J., Achermann J.C., Sultan C. Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Hum. Reprod.* 2007; 22: S. 3255–61.
- [82] Rajpert-De Meyts E., Jørgensen N., Graem N., Müller J., Cate R.L., Skakkebaek N.E. Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: S. 3836–44.
- [83] Reuter A.L., Goji K., Bingham N.C., Matsuo M., Parker K.L. A novel mutation in the accessory DNA-binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.* 2007; 157: S. 233–8.

- [84] Röpke A., Tewes A.-C., Gromoll J., Kliesch S., Wieacker P., Tüttelmann F. Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21: S. 1012–5.
- [85] Sablin E.P., Blind R.D., Krylova I.N., Ingraham J.G., Cai F., Williams J.D., Fletterick R.J., Ingraham H.A. Structure of SF-1 bound by different phospholipids: evidence for regulatory ligands. *Mol. Endocrinol.* 2009; 23: S. 25–34.
- [86] Sadosky Y., Crawford P.A., Woodson K.G., Polish J.A., Clements M.A., Tourtellotte L.M., Simburger K., Milbrandt J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; 92: S. 10939–43.
- [87] Salas-Cortés L., Jaubert F., Barboux S., Nessmann C., Bono M.R., Fellous M., McElreavey K., Roseblatt M. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int. J. Dev. Biol.* 1999; 43: S. 135–40.
- [88] Scherrer S.P., Rice D.A., Heckert L.L. Expression of steroidogenic factor 1 in the testis requires an interactive array of elements within its proximal promoter. *Biol. Reprod.* 2002; 67: S. 1509–21.
- [89] Schlessinger D., Garcia-Ortiz J.-E., Forabosco A., Uda M., Crisponi L., Pelosi E. Determination and stability of gonadal sex. *J. Androl.* 2010; 31: S. 16–25.
- [90] Sekido R., Bar I., Narváez V., Penny G., Lovell-Badge R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* 2004; 274: S. 271–9.
- [91] Sekido R., Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature.* 2008; 453: S. 930–4.
- [92] Shen J.H.-C., Ingraham H.A. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol.* 2002; 16: S. 529–40.
- [93] Shen W.H., Moore C.C., Ikeda Y., Parker K.L., Ingraham H.A. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell.* 1994; 77: S. 651–61.
- [94] Shima Y., Miyabayashi K., Baba T., Otake H., Katsura Y., Oka S., Zubair M., Morohashi K. Identification of an enhancer in the Ad4BP/SF-1 gene specific for fetal Leydig cells. *Endocrinology.* 2012; 153: S. 417–25.
- [95] Shima Y., Zubair M., Ishihara S., Shinohara Y., Oka S., Kimura S., Okamoto S., Minokoshi Y., Suita S., Morohashi K. Ventromedial hypothalamic nucleus-specific enhancer of Ad4BP/SF-1 gene. *Mol. Endocrinol.* 2005; 19: S. 2812–23.
- [96] Shima Y., Zubair M., Komatsu T., Oka S., Yokoyama C., Tachibana T., Hjalt T.A., Drouin J., Morohashi K. Pituitary homeobox 2 regulates adrenal4 binding protein/steroidogenic factor-1 gene transcription in the pituitary gonadotrope through interaction with the intronic enhancer. *Mol. Endocrinol.* 2008; 22: S. 1633–46.
- [97] Shimamura R., Fraizer G.C., Trapman J., Lau YfC null, Saunders G.F. The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Müllerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin. Cancer Res.* 1997; 3: S. 2571–80.

- [98] Shinoda K., Lei H., Yoshii H., Nomura M., Nagano M., Shiba H., Sasaki H., Osawa Y., Ninomiya Y., Niwa O. Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev. Dyn.* 1995; 204: S. 22–9.
- [99] Sıklar Z., Berberoğlu M., Ceylaner S., Çamtosun E., Kocaay P., Göllü G., Sertçelik A., Öcal G. A novel heterozygous mutation in steroidogenic factor-1 in pubertal virilization of a 46,XY female adolescent. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2014; 27: S. 98–101.
- [100] Stocco D.M., Clark B.J. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem. Pharmacol.* 1996; 51: S. 197–205.
- [101] Sugawara T., Kiriakidou M., McAllister J.M., Kallen C.B., Strauss J.F. Multiple steroidogenic factor 1 binding elements in the human steroidogenic acute regulatory protein gene 5'-flanking region are required for maximal promoter activity and cyclic AMP responsiveness. *Biochemistry.* 1997; 36: S. 7249–55.
- [102] Sugawara T., Saito M., Fujimoto S. Sp1 and SF-1 interact and cooperate in the regulation of human steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Endocrinology.* 2000; 141: S. 2895–903.
- [103] Svechnikov K., Landreh L., Weisser J., Izzo G., Colón E., Svechnikova I., Söder O. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr.* 2010; 73: S. 93–101.
- [104] Swain A., Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev.* 1999; 13: S. 755–67.
- [105] Taguchi O., Cunha G.R., Lawrence W.D., Robboy S.J. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev. Biol.* 1984; 106: S. 394–8.
- [106] Tajima T., Fujiwara F., Fujieda K. A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46, XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure. *Endocr. J.* 2009; 56: S. 619–24.
- [107] Takasawa K., Kashimada K., Pelosi E., Takagi M., Morio T., Asahara H., Schlessinger D., Mizutani S., Koopman P. FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *FASEB J.* 2014; 28: S. 2020–8.
- [108] Takayama K., Sasano H., Fukaya T., Morohashi K., Suzuki T., Tamura M., Costa M.J., Yajima A. Immunohistochemical localization of Ad4-binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1995; 80: S. 2815–21.
- [109] Taketo M., Parker K.L., Howard T.A., Tsukiyama T., Wong M., Niwa O., Morton C.C., Miron P.M., Seldin M.F. Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics.* 1995; 25: S. 565–7.
- [110] Tantawy S., Lin L., Akkurt I., Borck G., Klingmüller D., Hauffa B.P., Krude H., Biebermann H., Achermann J.C., Köhler B. Testosterone production during puberty in two 46,XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations. *Eur. J. Endocrinol.* 2012; 167: S. 125–30.

- [111] Tantawy S., Mazen I., Soliman H., Anwar G., Atef A., El-Gammal M., El-Kotoury A., Mekkawy M., Torky A., Rudolf A., Schrupf P., Grüters A., Krude H., Dumargne M.-C., Astudillo R., Bashamboo A., Biebermann H., Köhler B. Analysis of the gene coding for steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in a cohort of 50 Egyptian patients with 46,XY disorders of sex development. *Eur. J. Endocrinol.* 2014; 170: S. 759–67.
- [112] Thyen U., Lanz K., Holterhus P.-M., Hiort O. Epidemiology and initial management of ambiguous genitalia at birth in Germany. *Horm. Res.* 2006; 66: S. 195–203.
- [113] Tremblay J.J., Viger R.S. Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol. Endocrinol.* 1999; 13: S. 1388–401.
- [114] Tremblay J.J., Viger R.S. GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology.* 2001; 142: S. 977–86.
- [115] Ueda H., Sun G.C., Murata T., Hirose S. A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 1992; 12: S. 5667–72.
- [116] Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A.-C., Klugmann C., Klasen C., Holter N.I., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J., Lovell-Badge R., Treier M. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009; 139: S. 1130–42.
- [117] Umesono K., Evans R.M. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell.* 1989; 57: S. 1139–46.
- [118] Urs A.N., Dammer E., Sewer M.B. Sphingosine regulates the transcription of CYP17 by binding to steroidogenic factor-1. *Endocrinology.* 2006; 147: S. 5249–58.
- [119] Val P., Lefrançois-Martinez A.-M., Veyssi re G., Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor.* 2003; 1: S. 8.
- [120] Walsh H.E., Shupnik M.A. Proteasome regulation of dynamic transcription factor occupancy on the GnRH-stimulated luteinizing hormone beta-subunit promoter. *Mol. Endocrinol.* 2009; 23: S. 237–50.
- [121] Wang R., Dong Z., Wang W., Xiao Y., Ni J., Wang D. Mutation analysis of the SRD5A2, AR and SF-1 genes in 52 Chinese boys with hypospadias. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2013; 26: S. 887–93.
- [122] Wang W., Zhang C., Marimuthu A., Krupka H.I., Tabrizizad M., Shelloe R., Mehra U., Eng K., Nguyen H., Settachatgul C., Powell B., Milburn M.V., West B.L. The crystal structures of human steroidogenic factor-1 and liver receptor homologue-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102: S. 7505–10.
- [123] Warman D.M., Costanzo M., Marino R., Berensztein E., Galeano J., Ramirez P.C., Saraco N., Baquedano M.S., Ciaccio M., Guercio G., Chaler E., Maceiras M., Lazzatti J.M., Bailez M., Rivarola M.A., Belgorosky A. Three new SF-1 (NR5A1) gene mutations in two unrelated families with multiple affected members: within-family variability in 46,XY subjects and low ovarian reserve in fertile 46,XX subjects. *Horm Res Paediatr.* 2011; 75: S. 70–7.

- [124] Watanabe K., Clarke T.R., Lane A.H., Wang X., Donahoe P.K. Endogenous expression of Müllerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97: S. 1624–9.
- [125] Werner R., Holterhus P.-M., Binder G., Schwarz H.-P., Morlot M., Struve D., Marschke C., Hiort O. The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006; 91: S. 3515–20.
- [126] Werner R., Mönig I., August J., Freiberg C., Lünstedt R., Reiz B., Wunsch L., Holterhus P.-M., Kulle A., Döhnert U., Wudy S.A., Richter-Unruh A., Thorns C., Hiort O. Novel Insights into 46,XY Disorders of Sex Development due to NR5A1 Gene Mutation. *Sex Dev.* 2015; 9: S. 260–8.
- [127] de Wet J.R., Wood K.V., Helinski D.R., DeLuca M. Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985; 82: S. 7870–3.
- [128] Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842: S. 1942–50.
- [129] Wilhelm D., Englert C. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev.* 2002; 16: S. 1839–51.
- [130] Wu J.Y., McGown I.N., Lin L., Achermann J.C., Harris M., Cowley D.M., Aftimos S., Neville K.A., Choong C.S., Cotterill A.M. A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian cohort of 46,XY patients with disorders of sex development. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2013; 78: S. 545–50.
- [131] WuQiang F., Yanase T., Wei L., Oba K., Nomura M., Okabe T., Goto K., Nawata H. Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 311: S. 987–94.
- [132] Yagi H., Takagi M., Kon M., Igarashi M., Fukami M., Hasegawa Y. Fertility preservation in a family with a novel NR5A1 mutation. *Endocr. J.* 2015; 62: S. 289–95.
- [133] Zimmermann S., Schwärzler A., Buth S., Engel W., Adham I.M. Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1. *Mol. Endocrinol.* 1998; 12: S. 706–13.
- [134] Zubair M., Ishihara S., Oka S., Okumura K., Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol. Cell. Biol.* 2006; 26: S. 4111–21.
- [135] Normal sexual development. [Tag des Zugriffs: 20. Feb. 2017]; http://www.uptodate.com/contents/normal-sexual-development?source=search_result&search=geschlechtsentwicklung&selectedTitle=4%7E150
- [136] Stellungnahme Intersexualität Deutscher Ethikrat. [Tag des Zugriffs: 22. Feb. 2017]; <http://www.ethikrat.org/dateien/pdf/stellungnahme-intersexualitaet.pdf>

- [137] Bundesgesetzblatt. [Tag des Zugriffs: 28. Feb. 2017]; [https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//*\[@attr_id=%27bgbl113s1122.pdf%27\]#__bgbl__%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27bgbl113s1122.pdf%27%5D__1490723172846](https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?startbk=Bundesanzeiger_BGBl&start=//*[@attr_id=%27bgbl113s1122.pdf%27]#__bgbl__%2F%2F*%5B%40attr_id%3D%27bgbl113s1122.pdf%27%5D__1490723172846)
- [138] Beschluss des XII. Zivilsenats vom 22.6.2016 - XII ZB 52/15 -. [Tag des Zugriffs: 22. Feb. 2017]; <http://juris.bundesgerichtshof.de/cgi-bin/rechtsprechung/document.py?Gericht=bgh&Art=en&nr=75539&pos=0&anz=1>
- [139] Dual-Luciferase(R) Reporter Assay System Technical Manual TM040 - dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf. [Tag des Zugriffs: 20. Jan. 2017]; <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol.pdf>
- [140] Gel Shift Assays (EMSA) | Thermo Fisher Scientific. [Tag des Zugriffs: 20. Feb. 2017]; <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/gel-shift-assays-ems.html>
- [141] ExAC Browser. [Tag des Zugriffs: 28. Feb. 2017]; <http://exac.broadinstitute.org/variant/9-127262802-C-G>

7. Anhang

7.1. Hormonwerte der Patientinnen und Patienten

Patient/in	Alter [Jahre; Monate]	Testosteron [ng/dl]	FSH [IU/L]	LH [IU/L]	ACTH [pg/ml]	Cortisol [ng/ml]	Andere Untersuchungen
1 (c.51_65del)	Bei Geburt	< 1 (Ref: 2.8-362.9) hCG-Stimulation: 8	7.4 (Ref: <11)	<0.5		Synacthen-Test: Basal: 11 (Ref: 9.24-86.8) Stimuliert: 187 (Ref: 54-718)	hCG-Stimulation: Androstendion: Basal: 6 ng/dl (Ref: 11.4 – 60 ng/dl) Stimuliert: 40 ng/dl DHT: Basal: < 1 ng/dl (Ref: 2.8 – 11.6 ng/dl) Stimuliert: < 1 ng/dl
2 (c.118A>C)	Bei Geburt	20	13.2	3.9	54 (Ref: <60)	Synacthen-Test: Basal: 8.2 Stimuliert: 54.3	
	10; 7	82.6 hCG-Stimulation: 242	8.8	1.03			Inhibin B: 19 ng/L
	11; 3	135.8	16.5	2.27			Inhibin B: <10 ng/L
	11; 11	162	20.9	5.2			
	15; 8	508 (unter Supplementation von 37.5 mg Testosteron-Gel)	18.2	7.6	39.2	154	
	16					ACTH-Test: Basal: 182 Stimuliert: 319	

Patient/in	Alter [Jahre; Monate]	Testosteron [ng/dl]	FSH [IU/L]	LH [IU/L]	ACTH [pg/ml]	Cortisol [ng/ml]	Andere Untersuchungen
3 (c.382del)	25	104	97,9	47,9			DHT basal: 321,8 pg/ml Androstendion basal: 2,38 ng/ml
4a (c.630_636 del)	bei Geburt	187					
	0; 3,5	232 hCG-Stimulation: 735	3.7	2.6			Inhibin B: 144 ng/L hCG-Stimulation: DHT: Basal: 80 ng/dL Stimuliert: 469 ng/dL
	12	119	9	2.4			Inhibin B: 36.2 ng/L
	14; 7	297	16.2	3.4	69.4	170	
	16	344	27.1	7.5	45.9	96	Inhibin B: 15 ng/L
4b (c.630_636 del)	14; 5	16	90.7	31.6	25.16	38.5	Inhibin B: <10 ng/L
	15; 10		81.4	49.3			Estradiol: 28.5 ng/L (unter Supplementation)
5 (c.689T>G)	14	185 hCG-Stimulation: 230	51,5	18			AMH: 0,46 ng/ml Inhibin B: <0,1 ng/L Estradiol: 17,9 ng/L hCG-Stimulation: DHT: Basal: 6 ng/dl Stimuliert: 52 ng/dl Androstendion: Basal: 43 ng/dl Stimuliert: 100 ng/dl

7.2. Materialienindex

7.2.1. Für Bakterienkultur, Klonierung, DNA-Isolierung und Sequenzierung verwendete Materialien

100 bp DNA Ladder	New England BioLabs, USA
Agarose	Life Technologies, USA
AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems, USA
Bacto™ Agar	BD, USA
Desoxyribonucleosidtriphosphat-Mix	Bioline, UK
LB-Medium Capsuletten	MP Biomedicals, USA
NucleoSEQ®-Säulen	Macherey-Nagel, Deutschland
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific, USA
Restriktionsenzyme	New England BioLabs, USA
T4 DNA Ligase	New England BioLabs, USA
TE-Puffer, Endotoxin-free	Quiagen, Niederlande

7.2.2. Für Zellkultur und Transfektion verwendete Materialien

5x Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
Ampuwa®-Spüllösung	Fresenius Kabi, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
FuGene® HD	Promega, USA
Passive Lysis Buffer	Promega, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7,2)	Gibco®, Life Technologies, USA
Trypan Blue Solution	Fluka Analytical, Schweiz
Trypsin-EDTA	Gibco®, Life Technologies, USA

7.2.3. Für Herstellung der Proteinlysate und Western Blot verwendete Materialien

Acrylamid Rothiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Fiber pads Mini-Trans-Blot®	Bio-Rad, USA
Gel holder cassette Mini-Trans-Blot®	Bio-Rad, USA

Glass plates Mini PROTEAN 3 System	Bio-Rad, USA
Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER)	Thermo Scientific, USA
Nitrocellulose-Membran, 0,2 µm	Bio-Rad, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, USA
Proteaseinhibitor Complete Ultra Tablets Mini, EDTA free	Roche, Schweiz
Restore Plus Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, USA
Skim Milk Powder	Difco, BD, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Tween®-20	Sigma-Aldrich, USA
WesternLightning® Plus ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer, USA

7.2.4. Für Herstellung der Kern- und Zytoplasmaextrakte und Electrophoretic Mobility Shift Assays verwendete Materialien

Halt Protease Inhibitor Single-Use Cocktail EDTA-Free	Thermo Scientific, USA
Nylon-Membran Hybond-Nx	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Oligonukleotide	Metabion International AG, Deutschland

7.2.5. Für RNA-Isolierung und Reverse Transkription verwendete Materialien

10x TURBO DNase Puffer	Life Technologies, USA
5x First-Strand Puffer (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂)	Life Technologies, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, USA
Random-Primers DNA Labeling System	Life Technologies, USA
RNase-Inhibitor RNaseOUT	Thermo Scientific, USA
SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase (200 Units/µl)	Life Technologies, USA
TURBO DNase	Life Technologies, USA

7.2.6. Kits

Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, USA
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, USA
CloneJET™ PCR Cloning Kit	Thermo Scientific, USA
Dual Luciferase® Reporter Assay System	Promega, USA
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Quiagen, Niederlande
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, USA
High Pure PCR Product Purification Kit, Version 15.0	Roche, Schweiz
Light Shift Chemiluminescent EMSA Kit	Thermo Scientific, USA
NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Scientific, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Niederlande

7.2.7. Antikörper

Anti-cMyc-Antikörper (anti-cMyc-Peroxidase, mouse monoclonal antibody, clone 9E10(2), Cat.11814150001)	Roche, Schweiz
Anti-Aktin-Antikörper (Anti-Actin Affinity isolated Antibody, A2066, rabbit)	Sigma, USA
Anti-GAPDH-Antikörper (ab9485)	Abcam, UK
Anti-Lamin A-Antikörper ((H-102): sc-20680, Inc., Lot 478657)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-Rabbit-Antikörper (A6154, IgG, HRP-gekoppelt)	Sigma, USA

7.2.8. Einmalartikel

CELLSTAR® 24-Well Zellkultur Multiwell Platten	Greiner bio-one, Österreich
Costar® 96-Well Platte	Corning incorporated, USA
Cryo.s™ Einfrierröhrchen	Greiner bio-one, Österreich
Nunclon™ Surface 6-Well Platte	Thermo Scientific, USA
QIAshredder Homogenizer	Qiagen, Niederlande
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm ²	Sarstedt, Deutschland

7.2.9. Geräte und Computersoftware

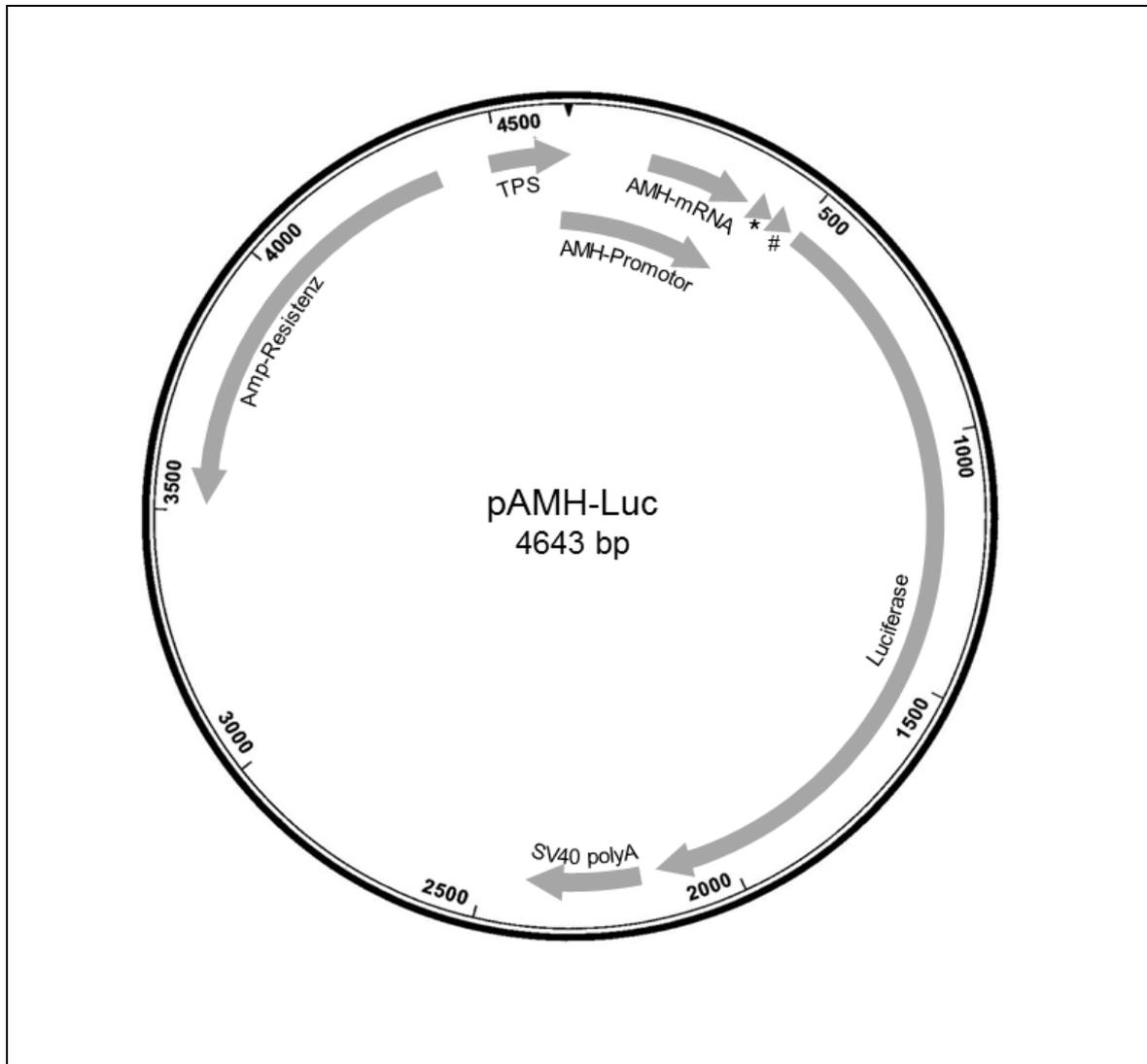
4-Kapillarsequenzierer 3130 Genetic Analyzers	Applied Biosystems, USA
Autoklav	Systec, Deutschland
Bio-ID (Version 15.02)	Vilber Lourmat, Deutschland
BioPhotometer plus	Eppendorf, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Deutschland
Cryo-Einfriergeräte Qualifreeze	Qualilab, Frankreich
Excel	Microsoft, USA
Fusion Chemoluminescence Imaging System	Vilber Lourmat, Deutschland
Inkubator	Memmert, Deutschland
Lasergene 6.0 (SeqBuilder, SeqManager)	DNASTAR, USA
Luminometer Lucy 3	Anthos Mikrosysteme, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Deutschland
Mikroskop Olympus CK2	Olympus, Japan
Mini Trans-Blot®-Kassette	Bio-Rad, USA
Mini-PROTEAN® 3 Cell Kammer	Bio-Rad, USA
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, USA
Rotanta AP Zentrifuge	Hettich, Deutschland
Schüttelinkubator Innova® 42 Incubator Shaker Series	New Brunswick Scientific, USA
Schüttler Unimax 1010	Heidolph, Deutschland
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Du Pont Instruments, USA
SpeedVac Concentrator SVC 100H, Savant	Thermo Scientific, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
UV-Crosslinker	Vilber Lourmat, Deutschland
Zellkulturbank GELAIRE Laminar Air Flow Class 100	GELMAN Instrument, UK
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Deutschland
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Deutschland

7.3. Primer

Name	Sequenz
CMV_forw	5'-GAT CCG GTA CTA GAG GAA CTG AAA AAC-3'
NR5A1_a118c_AS	5'-TGT TGT TCT GCA CCG GGC GCT TGA AGA AGC C-3'
NR5A1_a118c_S	5'-GGC TTC TTC AAG CGC CCG GTG CAG AAC AAC A-3'
NR5A1_del382_AS	5'-CCC CGA TGG GGT GCC CCC GCC G-3'
NR5A1_del382_S	5'-CGG CGG GGG CAC CCC ATC GGG G-3'
NR5A1_del51_65_AS	5'-TCC GTA GTG GTA GCC GCA CAC GGG GC-3'
NR5A1_del51_65_S	5'-GCC CCG TGT GCG GCT ACC ACT ACG GA-3'
NR5A1_del630_636_AS	5'-GGG CTC TGG GTA GGC AGC CCA GGC-3'
NR5A1_del630_636_S	5'-GCC TGG GCT GCC TAC CCA GAG CCC-3'
NR5A1_E6as_1138	5'-CCA GGC TGA AGA GGA TGA TG-3'
NR5A1_T689G_AS	5'-CTC CAG CTG CAG CCG CTG CAG GAT GAG-3'
NR5A1_T689G_S	5'-CTC ATC CTG CAG CGG CTG CAG CTG GAG-3'
pJET1.2 forward sequencing primer	5'-CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC-3'
pJET1.2 reverse sequencing primer	5'-AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG-3'
SF1_Ex2-3_IntS_RP	5'-CAA GAT CGA CAA GAC GCA G-3'
SF1_Ex4_IntAS_RP	5'-GCA GCA CGT AGT CCG GTG-3'
SF1_Ex4_IntS_RP	5'-GGC TTC AAG CTG GAG ACA G-3'

7.4. Plasmidkarten

7.4.1. pAMH-Luc



Legende

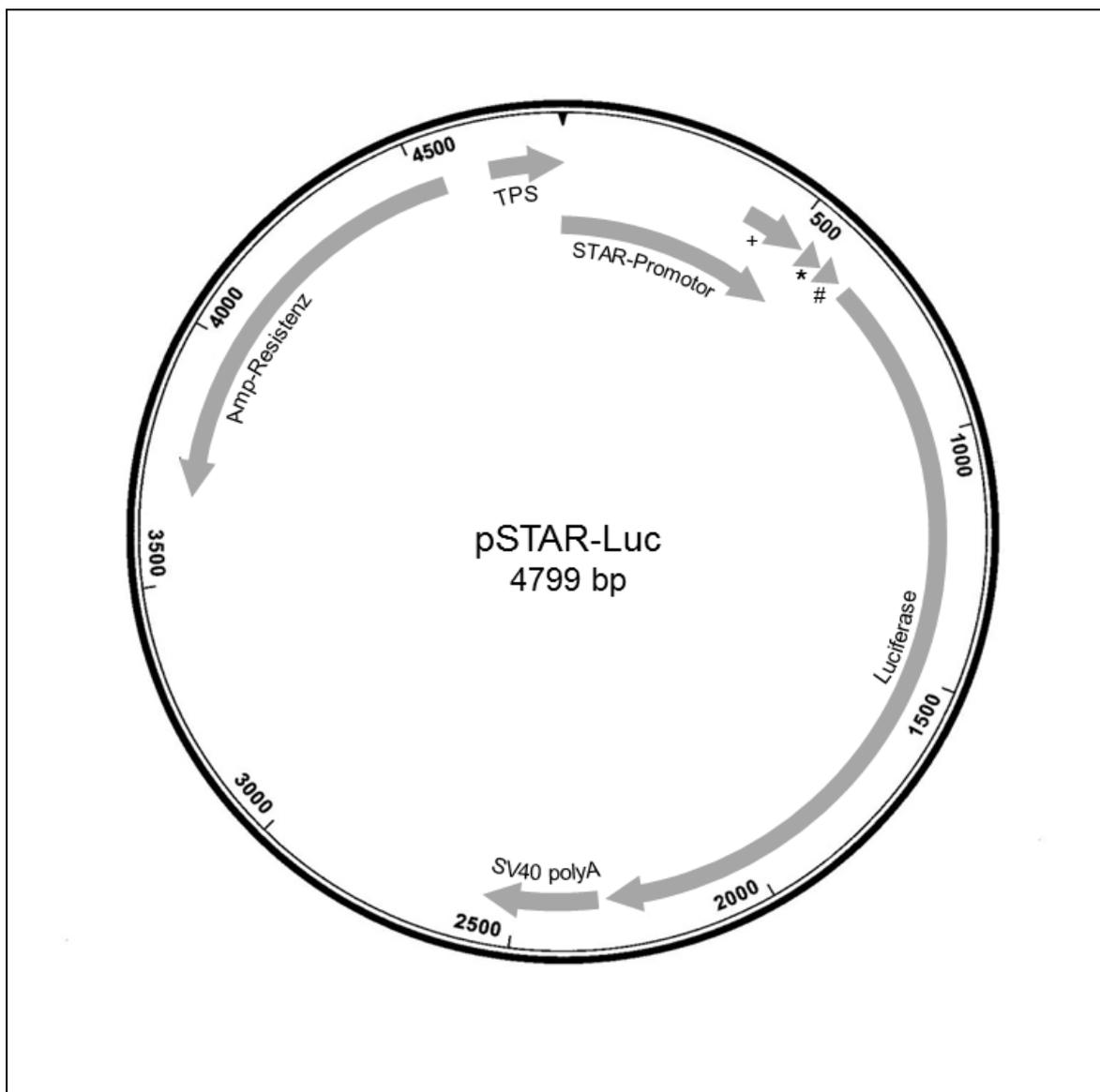
➔ Gen

TPS transcriptional pause site

* multiple cloning site

minimal promotor

7.4.2. pSTAR-Luc



Legende



Gen

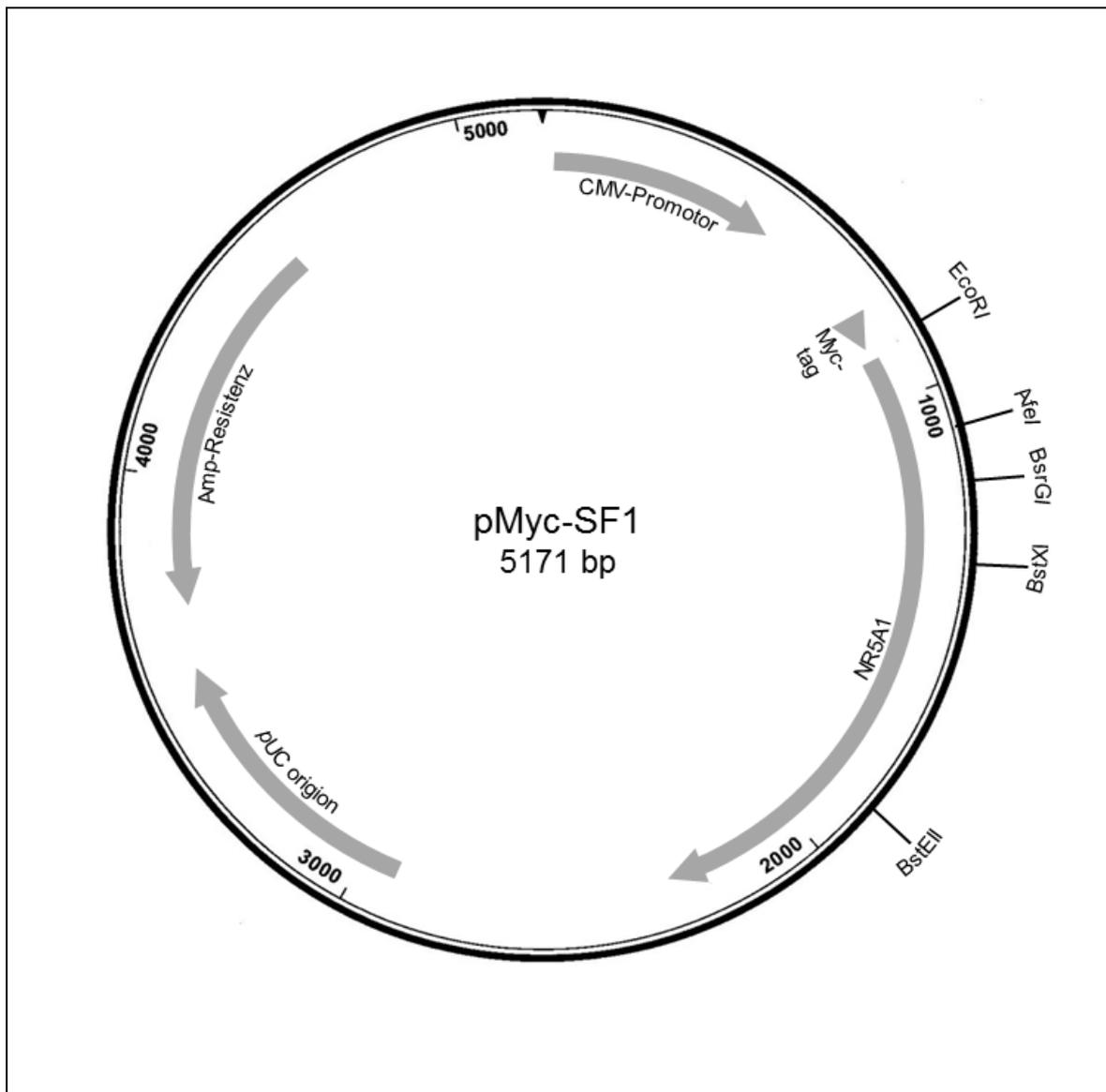
TPS transcriptional pause site

+ STAR mRNA

* multiple cloning site

minimal promotor

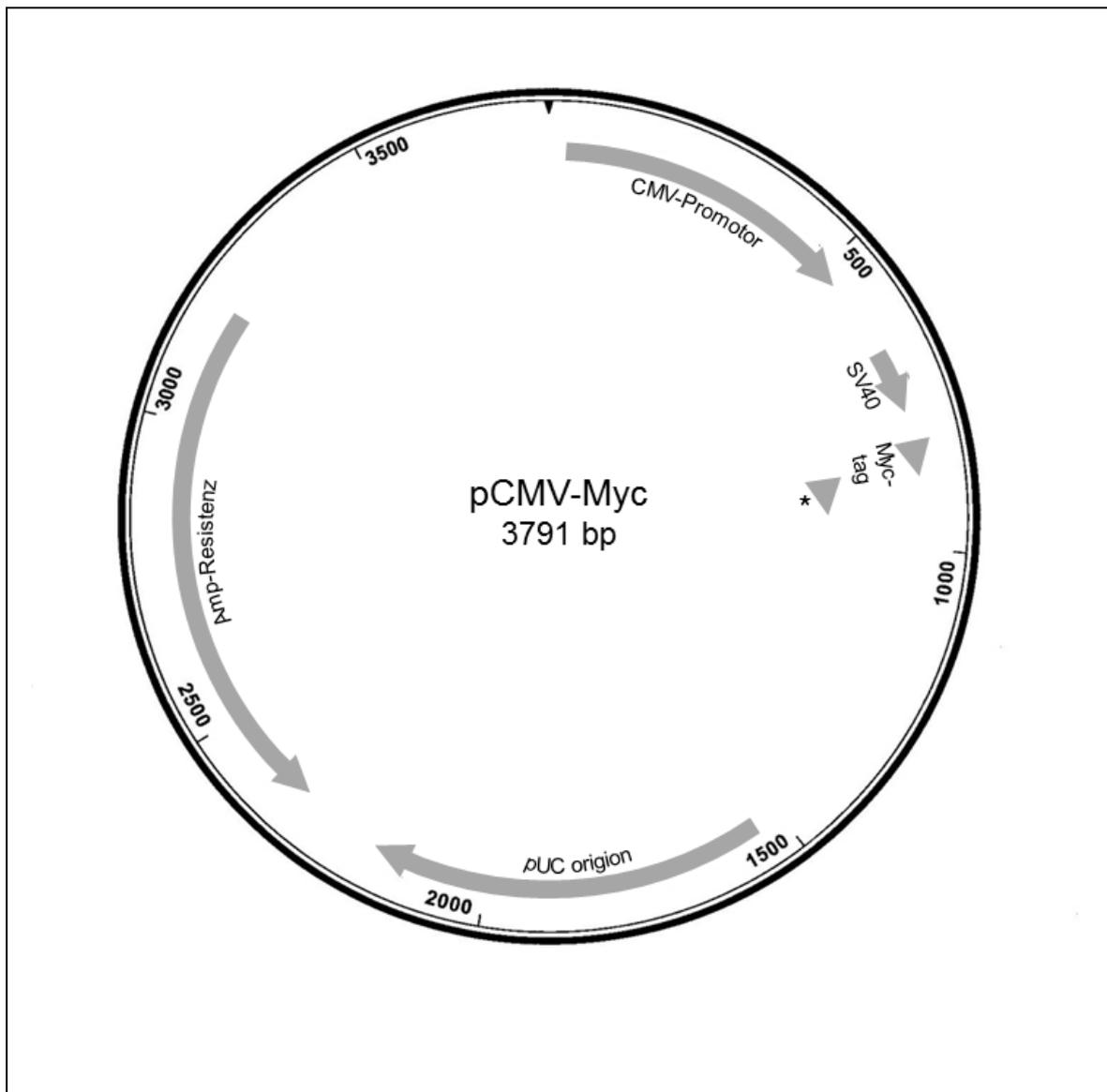
7.4.3. pMyc-SF1



Legende

- ➔ Gen
- | Schnittstellen Restriktionsenzyme

7.4.4. pCMV-Myc



Legende

➔ Gen

* multiple cloning site

7.5. Cycler-Programme

7.5.1. PCR-Mutagenese und RT-PCR

	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Aktivierungsschritt	98 °C	03:00 min	1
Denaturierung	98 °C	00:15 min	30
Primerhybridisierung	58 °C	00:30 min	
Elongation	72 °C	00:30 min	
	72 °C	03:00 min	1
Kühlung	4 °C		1

7.5.2. Sequenzierung

	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Initiale Denaturierung	96 °C	03:00 min	1
Primerhybridisierung	50 °C	00:20 min	24
Elongation	60 °C	04:00 min	
Denaturierung	96 °C	00:20 min	
	50 °C	00:20 min	1
	60 °C	04:00 min	1
Kühlung	4 °C		1

7.7. PCR-Mutagenese

	c.51_65 del	c.118A>C	c.382del	c.630_636del	c.689T>G
Primer A PCR 1	CMV_forw	CMV_forw	SF1_Ex2-3_IntS_RP	SF1_Ex4_IntS_RP	SF1_Ex2-3_IntS_RP
Primer B PCR 1	NR5A1_del51_65_AS	NR5A1_a118c_AS	NR5A1_del382_AS	NR5A1_del630_636_AS	NR5A1_T689G_AS
Annealing-Temp. PCR 1	57°C 00:30 min	58°C 00:30 min	58°C 00:30 min	61°C 00:30 min	60°C 00:30 min
Primer C PCR 2	NR5A1_del51_65_S	NR5A1_a118c_S	NR5A1_del382_S	NR5A1_del630_636_S	NR5A1_T689G_S
Primer D PCR 2	SF1_Ex4_IntAS_RP	SF1_Ex4_IntAS_RP	NR5A1_E6as_1138	NR5A1_E6as_1138	NR5A1_E6as_1138
Annealing-Temp. PCR 2	59°C 00:30 min	59°C 00:30 min	61°C 00:30 min	60°C 00:30 min	60°C 00:30 min
Primer A PCR 3	CMV_forw	CMV_forw	SF1_Ex2-3_IntS_RP	SF1_Ex4_IntS_RP	SF1_Ex2-3_IntS_RP
Primer D PCR 3	SF1_Ex4_IntAS_RP	SF1_Ex4_IntAS_RP	NR5A1_E6as_1138	NR5A1_E6as_1138	NR5A1_E6as_1138
Annealing-Temp. PCR 3	58°C 00:30 min	59°C 00:30 min	60°C 00:30 min	69°C 00:30 min	60°C 00:30 min

7.8. Restriktionsverdau

	Restriktionsenzym A	Restriktionsenzym B
p.D18_G22del (c.51_65del)	EcoRI-HF	BsrGI
p.T40P (c.118A>C)	EcoRI-HF	AfeI
p.V128CfsX168 (c.382del)	BsrGI	BstEII
p.Y211TfsX83 (c.630_636del)	BstXI	BstEII
p.L230R (c.689T>G)	BsrGI	BstEII

7.9. Acrylamid-Gele

7.9.1. Western Blot

	Trenngel	Sammelgel
5x Trenngel-Puffer (Tris 0,1875 M, SDS 0,05 %, pH 8,8)	2 ml	----
5x Sammelgel-Puffer (Tris 0,125 M, SDS 0,05 %, pH 6,8)	----	930 µl
Acrylamid Rothiphorese® Gel 30	3,5 ml	650 µl
Aqua dest.	4,5 ml	3,065 ml
APS 10 %	90 µl	30 µl
TEMED	9 µl	10 µl

7.9.2. Electrophoretic Mobility Shift Assay

Aqua dest.	15,2 ml
0,5x TBE-Puffer (0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 0,25 M EDTA)	5,4 ml
Acrylamid Rothiphorese® Gel 30	5,2 ml
APS 10%	180 µl
TEMED	18 µl

7.10. Sequenzen der im EMSA eingesetzten Oligonukleotide

Name	Sequenz (Das SF-1-Bindungselement ist dick gedruckt)
SF1_EMSA_mMISs	5'-GCC AGG CAC TGT CCC CCA AGG TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'
SF1_EMSA_mMISa	5'-TAT CAA CAC CAA AGG TGA CCT TGG GGG ACA GTG CCT GGC-3'
5Bio-SF1_EMSA_mMISs	5'-Biotin-GCC AGG CAC TGT CCC CCA AGG TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'
mMIS_mutS_EMSA	5'-GCC AGG CAC TGT CCC CCA ATT TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'

mMIS_mutA_EMSA	5'-TAT CAA CAC CAA AGG TGA AAT TGG GGG ACA GTG CCT GGC-3'
5Bio-mMIS_mutS_EMSA	5'-Biotin-GCC AGG CAC TGT CCC CCA ATT TCA CCT TTG GTG TTG ATA-3'

7.11. Buchstaben-Code der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Asparaginsäure	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q	Serin	Ser	S
Glutaminsäure	Glu	E	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	W
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

8. Danksagung

Abschließend möchte ich allen Beteiligten danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Olaf Hiort für die Bereitstellung dieses interessanten Themas. Vielen Dank für Ihre stets geduldige und freundliche Unterstützung, die Heranführung an das wissenschaftliche Arbeiten und die vielen wertvollen Anregungen bei der Ausarbeitung dieser Dissertation!

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Ralf Werner bedanken für die exzellente Betreuung, die viele Zeit, die er in dieses Projekt investiert hat und seine kompetente Anleitung und Beratung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Er wusste stets jedes Problem zu lösen und hat durch seine konstruktive Kritik auch bezüglich der schriftlichen Ausführung der Dissertation wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Frau Dagmar Struve und Frau Bettina Brix für die geduldige Einführung in die verwendeten Methoden, ihre ständige Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen sowie ihre herzliche und freundliche Art, durch die mir die Arbeit im Labor viel Freude bereitet hat und ich mich dort sehr wohl gefühlt habe.

Im Besonderen möchte ich mich bei meiner Familie und Hauke bedanken für die umfassende Unterstützung, den ständigen Rückhalt und die große Geduld, die sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit entgegen gebracht haben. Vielen Dank dafür!

9. Lebenslauf

Name: Isabel Mönig
 Geburtsdatum: 07.05.1990
 Geburtsort: Washington DC, USA



Schulische und universitäre Ausbildung

08/2000 – 06/2009	Gymnasium Altenholz Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/2009 – 05/2016	Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
09/2011	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2013 – 10/2013	Experimentelle Datenerhebung für die Dissertation
05/2015 – 04/2016	Praktisches Jahr: Innere Medizin: Kantonsspital Winterthur, Schweiz Chirurgie: Sana Klinikum Eutin Pädiatrie: Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH, Campus Lübeck
04/2015 und 05/2016	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,0)

Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2016	Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des UKSH, Campus Lübeck
--------------	---

Publikationen und Poster

Werner R.*, Mönig I.*, August J.*, Freiberg C., Lünstedt R., Reiz B., Wünsch L., Holterhus P.-M., Kulle A., Döhnert U., Wudy S.A., Richter-Unruh A., Thorns C., Hiort O. Novel Insights into 46,XY Disorders of Sex Development due to NR5A1 Gene Mutation. *Sex Dev.* 2015; 9: S. 260–8.

*geteilte Erstautorenschaft

Werner R., Mönig I., Lünstedt R., Wünsch L., Thorns C., Reiz B., Krause A., Schwab K.O., Binder G., Holterhus P.-M., Hiort O. New NR5A1 mutations and phenotypic variations of gonadal dysgenesis. *PLOS ONE.* 2017; 12: S. e0176720.

Mönig I., Lünstedt R., Hiort O., Werner R. SF-1 – ein Schalter in der Geschlechtsentwicklung. Poster, Siebter Lübecker Doktorandentag 2013

Mönig I., Lünstedt R., Hiort O., Werner R. DSD-Patienten mit 6 neuen heterozygoten SF-1-Mutationen und stark variablem Phänotyp. Poster, JA-PED 2013, ausgezeichnet mit dem Poster-Preis für Grundlagenforschung der DGKED

Werner R., Mönig I., Lünstedt R., Struve D., Strom T., Hiort O. Extreme phenotypic variability of two siblings with 46,XY DSD and a disrupting frame shift mutation in exon 4 of the NR5A1 gene. Poster, ESPE 2013