

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung von heterozygoten Mutationen
des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY
Störungen der Geschlechtsentwicklung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rebekka Anna-Maria Astudillo

aus Tübingen

Datum der Promotion: 17. September 2021

„Biology is truly a land of unlimited possibilities“

Freud, 1920

Vorwort

Diese Dissertation fasst die Ergebnisse der durchgeführten funktionellen Analysen von heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung zusammen.

Anteile dieser Dissertation wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

- Sally Tantawy, Inas Mazen, Hala Soliman, Ghada Anwar, Abeer Ate, Mona El-Gammal, Ahmed El-Kotoury, Mona Mekkawy, Ahmad Torkey, Agnes Rudolf, Pamela Schrupf, Annette Grütters, Heiko Krude, Marie-Charlotte Dumargne, Rebekka Astudillo, Anu Bashamboo, Heike Biebermann and Birgit Köhler, 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, European Journal of Endocrinology, 2014

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungen	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abstract	X
1. Einleitung	1
1.1. Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD).....	1
1.2. Ätiologie und Klinik bei XY-DSD	3
1.3. Physiologie der Geschlechtsentwicklung bei Säugetieren.....	4
1.4. Steroidogenetischer Faktor 1 (SF1).....	7
1.4.1. Struktur	8
1.4.2. Funktion	8
1.4.3. In vivo Analysen von SF1	10
1.4.4. Korrelierende Phänotypen beim Menschen	10
1.4.5. In dieser Arbeit untersuchte SF1-Mutationen und korrelierende Phänotypen beim Menschen.....	11
1.5. In vitro Analysen von SF1.....	14
1.5.1. In vitro Modell der Geschlechtsentwicklung	16
1.5.2. Verwendete Promotoren/Enhancer	17
1.5.3. Verwendete Kofaktoren	19
1.5.4. Dominant-negative Effekte bei Haploinsuffizienz	20
1.6. Zielsetzung der Dissertation	21
2. Material und Methoden	25
2.1. Geräte und Materialien	25
2.1.1. Geräte	25
2.1.2. Chemikalien	26
2.1.3. Bakterienstämme und Zelllinien.....	29
2.1.4. Plasmide	30

2.1.5. Primer	34
2.1.6. Software.....	37
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese	38
2.2.2. Transformation von chemisch kompetenten E.coli.....	42
2.2.3. DNA-Aufarbeitung und -Lagerung	43
2.2.4. Agaroseelektrophorese	44
2.2.5. Restriktionslängenmorphismus.....	45
2.2.6. Sequenzierung	46
2.2.7. Zellkultivierung	48
2.2.8. Transfektion	49
2.2.9. Duale Luciferase Assays	51
2.2.10. Umrechnung der Rohdaten, statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse	54
3. Ergebnisse	57
3.1. Überprüfung der Expressionsvektoren	57
3.2. Optimierung der dualen Luciferase Assays	57
3.2.1. Auswahl der Negativkontrolle	58
3.2.2. Transfektionseffizienz.....	61
3.2.3. Konzentrations-Wirkungskurven.....	62
3.3. Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch p.R62C und p.A154T.....	64
3.4. Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch SF1-Mutationen sowie Kotransfektionen.....	66
3.4.1. SOX9 Enhancer TESCO als Marker der Testisdeterminierung.....	67
3.4.2. CYP11A1-Promoter als Marker der Leydigzellfunktion	74
3.4.3. AMH-Promoter als Marker der Sertolizellfunktion	76
4. Diskussion	79
4.1. Validierung der dualen Luciferase Assays.....	79
4.2. Fragestellung 1: Zellsystem.....	80
4.3. Fragestellung 2: Neue Mutationen.....	81
4.4. Fragestellung 3: Genotyp-Phänotyp	82

4.4.1. SOX9 Enhancer TESCO	83
4.4.2. CYP11A1	87
4.4.3. AMH.....	90
4.5. Allgemeine Phänotypen-Variabilität.....	92
4.6. Zusammenfassung	95
5. Literaturverzeichnis	97
Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung.....	XIII
Lebenslauf.....	XV
Publikationsliste	XVII
Danksagung	XVIII

Abkürzungen

AGS	Adrenogenitales Syndrom
AMH	Anti-Müller'sches-Hormon
CYP11A1	Cytochrome P450 family 11 subfamily a member 1 (Gen von <i>cholesterol side-chain cleavage enzyme/Cyp 450scc</i>)
CYP17A1	Cytochrome P450 family 17 subfamily a member 1 (Gen von <i>Steroid-17α-Hydroxylase</i>)
CYP19A1	Cytochrome P450 family 19 subfamily a member 1 (Gen von <i>Aromatase</i>)
DAX1	Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DHH	Desert hedgehog protein
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DSD	Disorders of sex development, Störungen der Geschlechtsentwicklung
FGF	Fibroblast-growth-factor
FOG2	Friend of GATA4 protein 2
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GATA4	GATA binding protein 4
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
hCG	hCG
HR	Hinge-Region
HSD3B	<i>3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase</i>
ILF3	Insulin like factor 3
INSL3	Insulin like 3 (Gen)
kDA	Kilodalton
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LH	Luteinisierungshormon
LH β	Luteinizing hormone subunit beta (Gen von LH)
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
RSPO	R-spondins (Enhancer des WNT-Signalweges)
SF1	Steroidogenetischer Faktor 1 (Protein von NR5A1)
SNP's	Single nucleotide polymorphisms/ Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOX9	SRY-related HMG box containing gene 9
SRY	Sex-determining region on chromosome Y
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
MAP3-Kinase	<i>Mitogen-activated-protein-kinase-kinase-kinase</i>
NR	Nukleäre Rezeptoren
NR5A1	Nuclear receptor subfamily 5 group a member 1 (Gen von SF1)

Abkürzungen

PCR	polymerase chain reaction/ Polymerase-Kettenreaktion
PDGF-B	Platelet-derived growth factor subunit B
PGD2	Prostaglandin D2
TGF- β	Transforming growth factor beta
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
WNT4	Wingless-type MMTV [mouse mammary tumor virus] integration site Family, member 4
WT	Wildtyp
WT1	Wilms Tumorprotein, Gen: Wilms-Tumorsuppressorgen
WTA	Relative Wildtypaktivität (Referenz: SF1-Wildtyp)

Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Gonadendeterminierung und Genitalentwicklung mit beteiligten Genen.....	7
<u>Abbildung 2:</u> Schematische Darstellung der Struktur des Steroidogenetischen Faktors 1.....	8
<u>Abbildung 3:</u> Konservierung von SF1 bei verschiedenen Spezies und Lokalisation der Mutationen p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L375F.....	14
<u>Abbildung 4:</u> Schematischer Überblick der Geschlechtsentwicklung als in vitro Modell für die funktionelle Analyse von SF1 und Interaktionseffekte mit Kofaktoren.....	16
<u>Abbildung 5:</u> Implikation des dominant-negativen Effektes/ GATA4-/SF1-Synergismus in der humanen männlichen Geschlechtsentwicklung.....	21
<u>Abbildung 6:</u> Vektorkarten pcDNA3 und pCS2+.....	33
<u>Abbildung 7:</u> Übersicht über die Abfolge der Arbeitsschritte.....	38
<u>Abbildung 8:</u> Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese.....	40
<u>Abbildung 9:</u> Durch Firefly und Renilla Luciferase katalysierte Biolumineszenz-Reaktionen.....	52
<u>Abbildung 10:</u> Prinzip der dualen Luciferase Assays.....	53
<u>Abbildung 11:</u> Restriktionslängenmorphismus zum Vergleich der Bandenstärke von SF1-WT und SF1-Mutanten.....	57
<u>Abbildung 12:</u> Vergleich der Negativkontrollen pCS2-Leervektor, pcDNA3-Leervektor und pcDNA3-MC4R-Vektor in HEK293-Zellen (n=1).....	59
<u>Abbildung 13:</u> Untersuchung des Synergie-Effektes von SF1-WT und GATA4 auf den AMH-Promoter mit den verschiedenen Negativkontrollen pCS2-Leervektor, pcDNA3-Leervektor und pcDNA3-MC4R-Vektor in HEK293-Zellen (n=1).....	60
<u>Abbildung 14:</u> Transfektionseffizienz: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT bei Transfektion mit Fugene-Mengen von 0,1 µl bis 0,6 µl in TM4-Zellen (n=1).....	61
<u>Abbildung 15:</u> Konzentrationswirkungskurven von SF1-WT und SF1-Mutanten: Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO in Konzentrationen von 1 – 13 ng in HEK293-Zellen (n=2).....	63
<u>Abbildung 16:</u> Konzentrationswirkungskurve von SF1-WT und SF1-Mutanten: Aktivierung des CYP11A1-Promoters in Konzentrationen von 1 – 13 ng in HEK293-Zellen (n=4).....	63
<u>Abbildung 17:</u> Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO (n=2), CYP11A1-Promoter (n=2) und AMH-Promoter (n=3) durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C und p.A154T in HEK293-Zellen.....	65
<u>Abbildung 18:</u> Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=5) und Sertolizellen (TM4, n=3).....	67
<u>Abbildung 19:</u> Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner SOX9 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3).....	69
<u>Abbildung 20:</u> Interaktionsanalyse von SF1-WT und den SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner SOX9 auf SOX9 Enhancer TESCO in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3).....	71
<u>Abbildung 21:</u> Einfacher dominant-negativer Assay: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT sowie die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit SF1-WT in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3).....	72
<u>Abbildung 22:</u> Dominant-negativer Synergie-Assay: Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO durch SF1-WT mit dem Interaktionspartner SOX9 sowie die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit SF1-WT und SOX9 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3).....	73

Abbildung 23: Aktivierung des CYP11A1-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=7) und Sertolizellen (TM4, n=5).75

Abbildung 24: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=6).76

Abbildung 25: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner GATA4 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=6).77

Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Klassifikation/Einteilung der Geschlechtsentwicklungsstörungen (DSD).	2
<u>Tabelle 2:</u> Lokalisation der SF1-Mutationen und Übersicht über Phänotypen der Patienten im Alter der Diagnosestellung sowie deren diagnostische Parameter.....	12
<u>Tabelle 3:</u> Übersicht über zentrale Enhancer und Promotoren der Geschlechtsentwicklung sowie ihrer Funktion in vivo und in vitro.	17
<u>Tabelle 4:</u> Phänotypen und Schweregrad der Gonadendysgenese der beschriebenen Mutationen.	24
<u>Tabelle 5:</u> Verwendete Geräte und Hersteller	25
<u>Tabelle 6:</u> Verwendete kommerziell erworbene Chemikalien und Reagenzien sowie Hersteller	26
<u>Tabelle 7:</u> Verwendete kommerziell erworbene Enzyme und Hersteller	27
<u>Tabelle 8:</u> Verwendete kommerziell erworbene Reagenziensysteme und Hersteller	27
<u>Tabelle 9:</u> Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer	27
<u>Tabelle 10:</u> Zusammensetzung der verwendeten Medien in der Bakterienkultur	28
<u>Tabelle 11:</u> Zusammensetzung der verwendeten Medien in der Zellkultur	29
<u>Tabelle 12:</u> Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren.....	31
<u>Tabelle 13:</u> Übersicht über die verwendeten Reportervektoren	32
<u>Tabelle 14:</u> Sequenzierungsprimer der Inserts NR5A1 und GATA4	34
<u>Tabelle 15:</u> Sequenzierungsprimer der Vektoren	34
<u>Tabelle 16:</u> Verwendete Mutageneseprimer	34
<u>Tabelle 17:</u> Messeinstellungen der Mikrowin 2000 Software	37
<u>Tabelle 18:</u> Übersicht über die Ausgangsplasmide und hergestellten Plasmide.....	38
<u>Tabelle 19:</u> Pipettierschema für Mutagenese-PCR	40
<u>Tabelle 20:</u> PCR-Programm für Mutagenese PCR mit Temperaturgradient.....	41
<u>Tabelle 21:</u> PCR-Programm für Mutagenese-PCR.....	41
<u>Tabelle 22:</u> Pipettierschema des Restriktionsansatzes	46
<u>Tabelle 23:</u> Pipettierschema für den Sequenzieransatz.	47
<u>Tabelle 24:</u> PCR-Programm für Sequenzierung (Thermocycler Mastercycler ep gradient S)	47
<u>Tabelle 25:</u> Grundschemata der Transfektion zur Berechnung der Volumina der zu transfizierenden Konstrukte.....	50
<u>Tabelle 26:</u> Übersicht über die zeitlichen Abläufe von Aussaat, Transfektion und Durchführung der dualen Luciferase Assays.....	54
<u>Tabelle 27:</u> Transfektionsschema für eine unterschiedliche Anzahl an Transkriptionsfaktoren.....	62

Abstract

Abstract (Englisch)

Functional characterisation of heterozygous Steroidogenic Factor 1 (SF1/NR5A1) mutations in patients with XY-disorders of sex development

Background: XY-Disorders of sex development (XY-DSD) are congenital conditions of patients with XY-karyotype in which gonadal or anatomical sex is atypical. The transcription factor Steroidogenic Factor 1 (SF1, Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A member 1) is one of the key factors involved in gonadal and adrenal development and steroidogenesis. Until now, over 130 genetic variants of SF1 were described in different phenotypes of XY-DSD such as complete gonadal dysgenesis, severe and mild partial gonadal dysgenesis, hypospadias, infertility and bilateral anorchia. A comprehensive way of genotype-phenotype correlation has not been demonstrated yet.

Objective: To investigate genotype-phenotype correlation of naturally occurring heterozygous pointmutations of SF1 with a diverse spectrum of phenotypes from hypospadias to complete gonadal dysgenesis by functional in vitro studies.

Method: Investigation of the transcriptional activity of SF1 missense mutations on central promoters of gonadal development by Dual-Glo luciferase assays in human embryonal kidney cells (HEK293) and murine sertoli cells (TM4). As reporters the testis-specific SOX9 (SRY-related HMG box containing gene 9) Enhancer TESCO (Core Element of Testis Specific Enhancer of Sox 9), CYP11A1 (Cholesterol Side-chain Cleavage Enzyme) and AMH (Anti-Mullerian Hormone) reflecting sex determination and differentiation are used. Also synergy effects with known cofactors such as SOX9 and GATA4 (GATA binding protein 4) are investigated.

Results: SF1 missense mutations leading to partial and complete gonadal dysgenesis (p.G35E, p.R62C and p.L376F) show a significant reduced ability to activate the SOX9 Enhancer TESCO and the CYP11A1 promoter. They also fail to interact with cofactor SOX9 on the SOX9 Enhancer TESCO. They show minor reduction of transcriptional activity of the AMH promoter and reduced interaction effects with cofactor GATA4. SF1 missense mutations leading to infertility (p.P131L, p.P191C) show only moderate reduced ability to activate TESCO and failed to interact with the cofactor SOX9, for CYP11A1 they show a minor reduced activation. The variant p.A154T with hypospadias has no functional restriction.

Conclusion: The variant p.A154T is identified as a single nucleotide polymorphism. The transcriptional activity of the different SF1 mutations especially on the TESCO and CYP11A1 promoter reflect the severity of clinical expression of gonadal dysgenesis and fetal Leydig cell function in vitro. There cannot be found a rescue of the partial functional loss of function through the cofactor SOX9 for TESCO. However, prediction of the clinical phenotype because of correlations in functional analysis is not possible.

Abstract (Deutsch)

Funktionelle Charakterisierung von heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors (SF1/NR5A1) in Patienten mit XY-Störungen der Geschlechtsentwicklung

Hintergrund: XY-Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD) sind ein angeborener Zustand mit XY-Karyotyp und atypischem gonadalem oder anatomischem Geschlecht. Der Transkriptionsfaktor Steroidogenetischer Faktor 1 (SF1, Nukleärer Rezeptor Subfamilie 5 Gruppe A Mitglied 1) ist einer der Schlüsselfaktoren der gonadalen und adrenalen Entwicklung sowie Steroidogenese. Bisher wurden über 130 genetische SF1-Varianten mit variablen Phänotypen bei DSD beschrieben wie komplette gonadale Dysgenese, schwere und milde partielle Gonadendysgenesien, Hypospadien, Infertilität und bilaterale Anorchie. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte bisher nicht gezeigt werden.

Ziel der Studie: Untersuchung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation von natürlich vorkommenden heterozygoten SF1-Punktmutationen mit einem Spektrum an Phänotypen von Hypospadien bis hin zu kompletter gonadaler Dysgenese durch funktionelle in vitro Studien.

Methoden: Analyse der transkriptionellen Aktivität von SF1 Mutationen bei zentralen Promotoren der Geschlechtsentwicklung durch Dual-Glo Luciferase Assays in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und murinen Sertolizellen (TM4). Als Reporter werden der Testis-spezifische SOX9 (SRY-related HMG box containing gene 9) Enhancer TESCO (Core Element of Testis Specific Enhancer of Sox 9), CYP11A1 (Cholesterol Side-chain Cleavage Enzyme) und AMH (Anti-Müller'sches Hormon) verwendet, welche die Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung reflektieren. Auch Synergieeffekte mit den bekannten Kofaktoren SOX9 und GATA4 (GATA Bindungsprotein 4) werden untersucht.

Ergebnisse: Die SF1 Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F, welche zu partieller und kompletter Gonadendysgenese führen, zeigen einen signifikanten Aktivierungsverlust des SOX9 Enhancers TESCO und des CYP11A1-Promoters. Auch weisen sie reduzierte Interaktionseffekte mit dem Kofaktor SOX9 für den SOX9 Enhancer TESCO auf. Außerdem zeigen sie eine leichte Reduktion der transkriptionellen Aktivität für den AMH-Promoter und reduzierte Interaktionseffekte mit dem Kofaktor GATA4. Die SF1 Mutationen p.P131L, p.P191C, welche zu Infertilität führen, zeigen nur einen moderaten Aktivierungsverlust des SOX9 Enhancers TESCO und weisen ebenfalls verringerte Interaktionseffekte mit dem Kofaktor SOX9 auf. Für CYP11A1 zeigen sie eine leicht reduzierte Aktivierung. Die Variante p.A154T mit dem Phänotyp einer Hypospadie zeigt keine funktionelle Einschränkung.

Konklusion: Die p.A154T-Variante wird als Einzelnukleotid-Polymorphismus identifiziert. Die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen SF1-Mutationen insbesondere auf den SOX9 Enhancer TESCO und CYP11A1-Promoter reflektiert in vitro die Schwere der klinischen gonadalen Dysgenese und Beeinträchtigung der fetalen Leydigzellfunktion. Der partielle SF1-Funktionsverlust kann für den SOX9 Enhancer TESCO nicht durch den Kofaktor SOX9 ausgeglichen werden. Eine Vorhersage des klinischen Phänotyps aufgrund der Korrelation in der funktionellen Charakterisierung ist jedoch nicht möglich.

1. Einleitung

Das biologische Geschlecht als Resultat komplexer genetischer und hormoneller Einflüsse auf eine zunächst indifferente Gonade während der embryonalen Entwicklung fasziniert seit jeher die Wissenschaft. Die Geschlechtsentwicklung beeinflusst wesentlich Phänotyp, geschlechtsspezifisches Verhalten und Reproduktionsfähigkeit. Bei Störungen der Geschlechtsentwicklung kann es somit zu vielfältigen somatischen und psychischen Folgen kommen.

Störungen der Geschlechtsentwicklung können chromosomale Aberrationen zugrunde liegen oder, wie bei XX- und XY-Karyotypen, Defekte von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen. Die Untersuchungen von Mutationen bekannter Targetgene von Patienten mit Störungen der Geschlechtsentwicklung bieten die Möglichkeit, ein besseres Verständnis für deren zentrale Rolle in der Geschlechtsentwicklung zu erlangen.

Funktionelle Analysen als in vitro Modelle pathophysiologischer Mechanismen, wie in dieser Arbeit von Mutanten des Transkriptionsfaktors SF1 (Steroidogenetischer Faktor 1), ermöglichen im Rahmen der Grundlagenforschung Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp zu untersuchen.

1.1. Störungen der Geschlechtsentwicklung (DSD)

Störungen der Geschlechtsentwicklung oder Disorders of Sexual Development (DSD) sind ein angeborener Zustand mit atypischem chromosomalem (Art der vorhandenen Gonosomen, XY oder XX), gonadalem (Art der vorhandenen Keimdrüsen: Hoden, Ovarien, Mischformen) oder anatomischem Geschlecht (Art der vorhandenen Geschlechtsorgane: Penis, Vagina) (Lee et al., 2006). Klinisch imponieren sie durch äußere und innere Geschlechtsmerkmale, welche weiblich, männlich oder uneindeutig differenziert sein können, in einem Individuum.

Die Inzidenz von DSD beträgt in Deutschland 2/10000 Lebendgeburten, somit gehören DSD zu den seltenen Erkrankungen (Lee et al., 2016). Werden jedoch alle kongenitalen genitalen Anomalien inklusive Hypospadien und Kryptorchismus einbezogen, liegt die Inzidenz bei 1/200-300 Lebendgeburten (Lee et al., 2016).

2004 wurde auf Initiative der ESPE (European Society of Pediatric Endocrinology) und LWPES (Lawson & Wikins Society of Pediatric Endocrinology) ein Konsensustreffen von Experten ins Leben gerufen, in dem die derzeit gültige Terminologie und Klassifikation

nach Genotyp und pathophysiologischen Merkmalen definiert wurde (Tabelle 1). Sie verdeutlicht die Heterogenität des Patientenkollektivs.

Tabelle 1: Klassifikation/Einteilung der Geschlechtsentwicklungsstörungen (DSD). AMH (Anti-Müller'sches Hormon), LH (Luteinisierungshormon). In Anlehnung an (Hughes et al., 2006).

Numerische Aberrationen der Geschlechtschromosomen	XY-DSD	XX-DSD
<ul style="list-style-type: none"> • 45,X Turner Syndrom • 47,XXY Klinefelter Syndrom • 45,X/46,XY gemischte Gonadendysgenese • 46,XX/46,XY Chimerismus 	<ul style="list-style-type: none"> • Störungen der testikulären Entwicklung <ul style="list-style-type: none"> ○ Komplette und partielle Gonadendysgenese ○ Gonadale Regression ○ Ovotestikuläre DSD • Störungen der Androgensynthese oder –wirkung <ul style="list-style-type: none"> ○ Testosteronsynthesedefekte ○ Störungen der Testosteronwirkung ○ LH-Rezeptor-Defekte • AMH/AMH-Rezeptor-Defekte • Andere, z.B. schwere Hypospadie, kloakale Ekstrophie 	<ul style="list-style-type: none"> • Störungen der ovariellen Entwicklung <ul style="list-style-type: none"> ○ Ovotestikuläre DSD ○ Testikuläre DSD ○ Gonadale Dysgenese • Fetaler oder maternaler Androgenexzess <ul style="list-style-type: none"> ○ Fetal (Adrenogenitales Syndrom) ○ Maternal (Luteom, exogen) • Andere, z.B. kloakale Ekstrophie, Vaginalatresie, Uterusagenese

Für die Diagnosestellung sind die klinischen Merkmale, Laborparameter (inklusive endokrinologischen Funktionstests), Bildgebung (Sonographie, MRT), evtl. explorative Laparoskopie sowie genetische Untersuchungen, bestehend aus Karyogramm, CGH-Arrays, gezieltes oder paralleles Sequenzieren von Kandidatengenen (Arboleda et al., 2013) und Exom- bzw. Genomsequenzierung bedeutsam (Achermann et al., 2015; Audi et al., 2018). Neben den weitreichenden somatischen, psychischen und sozialen Konsequenzen kann es insbesondere bei dem Adrenogenitalen Syndrom (AGS) zu Komplikationen eines Salzverlustsyndroms aufgrund einer Nebenniereninsuffizienz kommen. Vor allem bei Gonadendysgenesen besteht das erhöhte Risiko einer malignen Entartung (Hughes et al., 2006). Die multidisziplinäre Betreuung und Therapie, bestehend aus chirurgischen Interventionen, medikamentöser Therapie sowie der eventuellen Behandlung und Prävention von Komplikationen, ist hochkomplex und sollte in spezialisierten Versorgungszentren erfolgen, welche ebenfalls eine psychosoziale

Begleitung ermöglichen können, wie ebenfalls in der seit 2016 gültigen S2k-Leitlinie (AWMF-Register Nr. 174/001) festgehalten (Krege et al., 2019).

1.2. Ätiologie und Klinik bei XY-DSD

Da in dieser Arbeit Mutationen des Transkriptionsfaktors SF1 (Steroidogenetischer Faktor 1) bei XY-DSD analysiert werden, wird im Folgenden auf XY-DSD eingegangen. XY-DSD sind Störungen der Geschlechtsentwicklung bei Patienten mit XY-Karyotyp und machen ca. 24% aller DSD aus (Cox et al., 2014).

Störungen der Geschlechtsentwicklung gehen auf Veränderungen während der embryonalen Entwicklung zurück. Diese können durch numerische oder strukturelle Variationen der Geschlechtschromosomen, Variationen in Genen, welche in der gonadalen und/oder genitalen Entwicklung eine Rolle spielen, Störungen in der gonadalen und/oder adrenalen Steroidogenese sowie maternalen und Umweltfaktoren verursacht sein (Audi et al., 2018). Bei XY-DSD mit Störungen der Testisentwicklung stützen sich derzeitige Hypothesen auf monogene Defekte. Bekannte Gene von XY-Gonadendysgenesien kodieren beispielsweise für die Transkriptionsfaktoren SRY (sex-determining region on chromosome Y), SOX9 (SRY-related HMG box containing gene 9), SF1 (Steroidogenetischer Faktor 1), GATA4 (GATA binding protein 4), DAX1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene1) und WT1 (Wilms-Tumorsuppressorgen), für Signalmoleküle wie DHH (desert hedgehog) und WNT4 (wingless-Type MMTV [mouse mammary tumor virus] integration site family, member 4) oder die *MAP3-Kinase 1* (*mitogen-activated-protein-kinase-kinase-kinase 1*) (Ono & Harley, 2013).

Die Gonadendysgenese wird in komplett und partiell eingeteilt:

Bei kompletten Gonadendysgenesien sind anstelle von Hoden bindegewebige Stränge („Streak-Gonaden“) vorhanden, die Patienten haben einen weiblichen Phänotyp und keine spontane Pubertät (Murphy et al., 2011). Sie erhalten eine medikamentöse Pubertätseinleitung und lebenslange Hormonsubstitution.

Bei partiellen Gonadendysgenesien liegt eine inkomplette, teilweise Ausbildung von Hodengewebe vor, das bindegewebig durchsetzt ist. Je nach Schweregrad wird sie als schwer oder mild eingestuft. Der Phänotyp mit genitaler Ambiguität ist abhängig von der Testosteronproduktion der dysgenetischen Testis (Murphy et al., 2011; Ostrer, 2008).

Patienten zeigen also je nach Schweregrad eine unterschiedliche Virilisierung, gegebenenfalls persistierende Müller'sche Strukturen und kommen spontan in die Pubertät. Im Laufe des Lebens entwickeln sie eine substitutionsbedürftige Gonadeninsuffizienz. Eine milde Form kann sich lediglich als Infertilität im fortgeschrittenen Lebensalter manifestieren (Anu Bashamboo et al., 2010).

Unter XY-DSD werden auch weitere Diagnosen gezählt wie die Hypospadie, deren Ursachen bisher nicht bekannt sind. Hypospadien sind häufige 2-8/1000 angeborene Entwicklungsstörungen der Harnröhre, sie entsprechen einem ventralen Fusionsdefekt der Urethra (Paulozzi, 1999). Der Meatus findet sich an der Unterseite des Penisschaftes auf unterschiedlicher Höhe. Bei einfachen Hypospadien befindet sich der Meatus penil, ab penoskrotalem Meatus spricht man von schweren Hypospadien. Ätiologisch wird eine Kombination aus genetischer Suszeptibilität und endokrinen Disruptoren vermutet. Eine verminderte Androgenwirkung, wie 5 α -Reduktase Defizienz oder Androgen-Rezeptor-Defekt, liegen bei ca. 20% der Patienten vor (Kalfa et al., 2009).

Es besteht eine Überschneidung zwischen den Spektren der schweren Hypospadie und der milden partiellen Gonadendysgenese: Je proximaler sich der Meatus an der Unterseite des Penisschaftes befindet, desto wahrscheinlicher eine Störung der Geschlechtsentwicklung (Kraft et al., 2011).

1.3. Physiologie der Geschlechtsentwicklung bei Säugetieren

Physiologisch findet die Geschlechtsentwicklung auf chromosomaler, gonadaler, genitaler und psychischer Ebene statt. Chromosomal und gonadal erfolgt die Geschlechtsdeterminierung, wobei die undifferenzierte Gonade in Testis oder Ovar differenziert. Die sekretierten Hormone führen bei der sexuellen Differenzierung zur Entwicklung genitaler und zentralnervöser Strukturen. Im Folgenden sind die aufeinander aufbauenden somatischen Entwicklungsstufen ausgeführt sowie in Abbildung 1 dargestellt.

1. Chromosomale Geschlechtsdeterminierung:

Zum Zeitpunkt der Befruchtung erfolgt die chromosomale Geschlechtsdeterminierung nach Art der vorhandenen Gonosomen. Das Y-Chromosom ist Träger von SRY (Sex-determining region on chromosome Y), XY-Embryonen entwickeln Testes, XX-Embryonen Ovarien (Larney et al., 2014).

2. Gonadale Geschlechtsdeterminierung und Entwicklung:

Die Gonadenentwicklung erfolgt, ebenso wie die Entwicklung der Nebennieren und Nieren (Birk et al., 2000; Hanley et al., 1999; Viger et al., 1998), aus einer gemeinsamen steroidogenetischen SF1-positiven Zellpopulation des intermediären Mesoderms (10. Tag der Mäuseentwicklung, E.10) (Brennan & Capel, 2004). Unabhängig von dem chromosomalen Geschlecht entwickelt sich unter dem Einfluss zahlreicher Transkriptionsfaktoren (wie SF1, SOX9, GATA4, WT1 und Lhx9 [Lim homeobox gene 9]) aus Mesoderm und Keimzellen eine indifferente Gonade (Birk et al., 2000; Hanley et al., 1999; Viger et al., 1998).

Aus heutiger Sicht wird bei der embryonalen Geschlechtsdeterminierung die Plastizität der bipotenten Gonade durch gegenseitige, antagonistische Signale zwischen männlichen und weiblichen Regulationsfaktoren kontrolliert (Zeitfenster von E11.5 und E12.5) (Warr & Greenfield, 2012). Für die Ausdifferenzierung des Testisgewebes wird angenommen, dass SRY als punktueller Initiator der genetischen Kaskade zusammen mit SF1 den Schlüsselregulator SOX9 hochreguliert (Ryohei Sekido et al., 2004). Die Aufrechterhaltung der SOX9-Transkription erfolgt über SF1 und einen Autoregulationsmechanismus mit einem positiven Feedback-Loop durch FGF (Fibroblast-growth-factor) und PGD2 (Prostaglandin D2) (Jakob & Lovell-Badge, 2011). Dadurch erfolgt die Rekrutierung weiterer Vorläuferzellen zentrifugal über die Gonade (Wilhelm et al., 2005, 2007). Die zunächst SRY-positiven, dann SOX9-positiven Vorläuferzellen differenzieren um E.12 in Pre-Sertolizellen (Albrecht & Eicher, 2001; Brennan & Capel, 2004). Während der weiteren embryonalen Entwicklung proliferieren die Sertolizellen und führen zur Differenzierung der Testes, Einwanderung der Keimzellen und Entwicklung der Testosteron-produzierenden Leydigzellen (Wilhelm et al., 2007).

Der männliche SOX9-Signalweg antagonisiert und supprimiert dabei den weiblichen WNT4/RSPO-Signalweg, welcher über β -Catenin die Ausdifferenzierung zum Ovar bedingen würde. Eine Aktivierung des weiblichen Signalweges bei der ovariellen Entwicklung würde ebenfalls die SF1-Aktivierung von SOX9 inhibieren und damit den männlichen Pathway supprimieren (Bernard et al., 2012).

3. Genitale Entwicklung:

Analog der gonadalen Entwicklung liegen in beiden Geschlechtern Genitalanlagen, bestehend aus zwei undifferenzierten Gangsystemen (Wolff'sche und Müller'sche Gänge) sowie dem Sinus Urogenitalis, vor. Diese werden über die hormonellen Einflüsse der Gonade in männliche und weibliche Genitale differenziert.

Die Sertolizellen des differenzierten Testisgewebes bewirken über die Produktion von AMH (Anti-Müller'sches Hormon) eine Rückbildung der Müllergänge, welche die Anlagen der weiblichen inneren Genitalorgane darstellen. Die Leydigzellen führen über die Androgenbiosynthese zur Differenzierung der männlichen inneren und äußeren Genitale: Testosteron bewirkt über den Androgenrezeptor eine Differenzierung der Wolff'schen Gänge in Samenleiter, -blase und Nebenhoden. In der Peripherie wird Testosteron in 5α -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt, welches ebenso über den Androgenrezeptor zu einer Differenzierung des Sinus urogenitalis in Penis, Hodensack und Prostata führt. Über ILF3 (Insulin like Factor 3) erfolgt der Deszensus der Hoden ins Skrotum.

Bei der Frau wird im sich entwickelnden Ovar kein AMH produziert, sodass sich die Müller'schen Gänge in das innere weibliche Genitale (Uterus, Tuba uterina und oberer Vagina) und der Sinus Urogenitalis in das äußere weibliche Genitale (Klitoris, Schamlippen, untere Vagina mit Scheideneingang) differenziert.

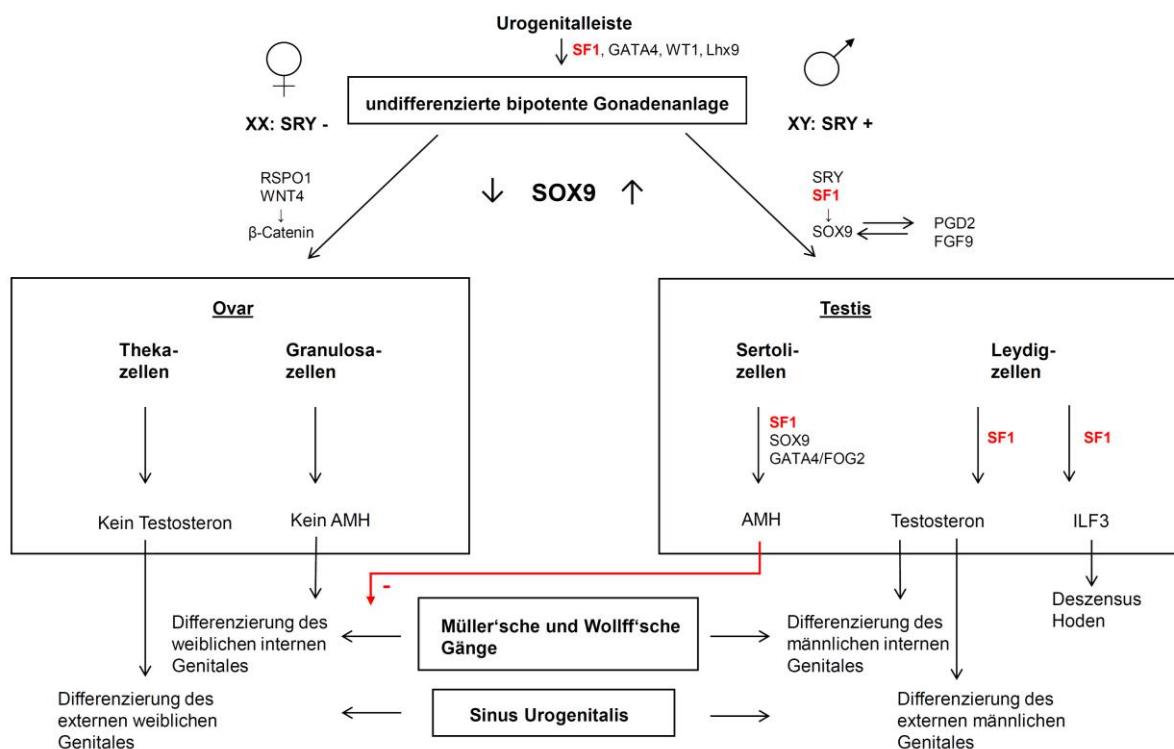


Abbildung 1: Gonadendeterminierung und Genitalentwicklung mit beteiligten Genen. Kein Anspruch auf Vollständigkeit. SF1 aufgrund der essentiellen Rolle rot hervorgehoben. Zahlreiche weitere Transkriptionsfaktoren wie GATA4, FOG2 (friend of GATA2), DAX1 (dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene 1) spielen bei dem Prozess der Geschlechtsdeterminierung zu verschiedenen Zeitpunkten ebenfalls eine Rolle.

1.4. Steroidogenetischer Faktor 1 (SF1)

SF1 Mutationen sind bei ca. 10-15% der XY-DSD nachgewiesen (El-Khairi & Achermann, 2012).

Das Gen Nuclear Receptor Subfamily 5 Group member 1 (NR5A1) kodiert für den Transkriptionsfaktor SF1, ein Protein aus 461 Aminosäuren. Es gehört zur Familie der Nukleären Rezeptoren (NR), welche als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren in Eukaryoten in Entwicklung und Physiologie eine wichtige Rolle spielen (Cotnoir-White et al., 2011). SF1 gilt noch als „orphan“ NR (Laudet, 1997) und als zentraler Regulator des adrenalen und reproduktiven endokrinen Systems. Er ist entlang unterschiedlicher Spezies hochkonserviert, zwischen Maus und Mensch 95% (K. L. Parker & Schimmer, 1997).

1.4.1. Struktur

SF1 gliedert sich in eine DNA-Bindungs-Domäne (DBD) mit 2 Zinkfingern, eine flexible Hinge-Region (HR), eine Liganden-Bindungs-Domäne (LBD) und zwei Aktivierungs-Funktions-Domänen (AF-1 und -2) (Abbildung 2). SF1 bindet über die DBD als Monomer an spezifische DNA-Sequenzen, welche in Promotorregionen des zu regulierenden Gens liegen (Wilson et al., 1993). Die DBD ist verantwortlich für die Spezifität der DNA-Bindung und stabilisiert diese (Little et al., 2006). Die flexible HR besitzt eine Phosphorylierungs- und eine Sumoylierungsposition, welche Proteinbindung, posttranskriptionale und -translationale Modifikation beeinflussen und relevant sind für die Transkriptions-Kapazität des Proteins (Hammer et al., 1999; Komatsu et al., 2004; Lewis et al., 2008). So kann beispielsweise die SF1-bedingte Transkription durch Phosphorylierung einer Serin-Position über den MAPK-Signalweg (mitogen-activated protein kinase) aktiviert werden (Babu et al., 2000). Die LBD besteht aus 12 Helices. Sie ist wichtig für die Ligandenbindung und Interaktion mit Kofaktoren. Die basale Aktivierung der Expression der Zielgene kann in Interaktion mit „Koaktivatoren“ oder „Korepressoren“ moduliert werden (Ito et al., 1997).

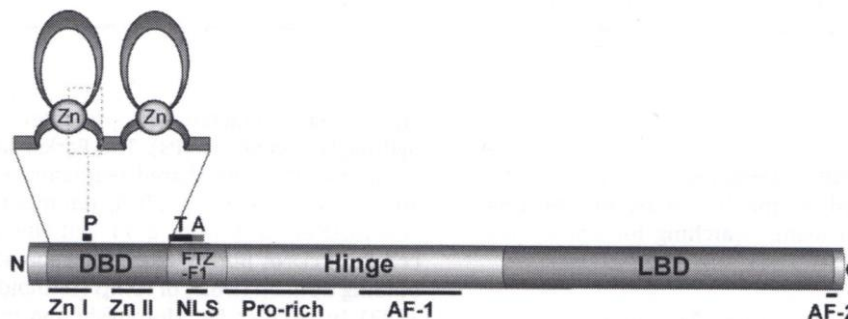


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur des Steroidogenetischen Faktors 1. DNA-Bindungsdomäne (DBD), Hinge-Region und Liganden-Bindungsdomäne (LBD) sind Strukturmerkmale der Nukleären Rezeptoren (NR). Weitere spezifische und funktionell relevante Elemente der DBD sind 2 Zinkfinger und P-Box (P). Die Fushi-tarazu Faktor 1 Box (FTZ-F1) als spezifische Domäne der NR5A Subklasse der NR enthält das nukleäre Lokalisations-Signal (NLS). Die Hinge Region besteht aus einer Prolin-reichen Region und der Aktivierungs-Funktionsdomäne 1 (AF-1), die LBD enthält die Aktivierungs-Funktionsdomäne 2 (AF-2). Darstellung aus (Hoivik et al., 2010).

1.4.2. Funktion

SF1 spielt bei beiden Geschlechtern eine essentielle Rolle in der gonadalen Entwicklung, sein Expressionsmuster divergiert jedoch während der Entwicklung von Testis und Ovar

(Jeyasuria et al., 2004). Während der embryonalen Entwicklung wird SF1 in der Urogenitalleiste exprimiert (beim Menschen ab 32 d post-ovulation (DPO), bei der Maus E9), welche sich (ab E11) in Gonaden und Nebennieren separiert und differenziert (Hanley et al., 1999; Ikeda et al., 1994). Bei der Testisentwicklung erhöht SF1 die transkriptionelle Aktivität von SRY und führt zusammen mit SOX9 (ab d 42 pc, E12.5-E15) zur Ausreifung der Hodenkanälchen und Sertolizellen (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008). In den Sertolizellen aktiviert SF1 mit SOX9 und GATA4 (ab d 49 pc) die AMH-Expression (De Santa Barbara et al., 1998). In den Leydigzellen aktiviert SF1 die Expression steroidogenetischer Enzyme (ab d56 pc) und beeinflusst über die Androgensynthese die genitale Geschlechtsentwicklung. Über ILF3 (Insulin-Like-Factor 3) koordiniert SF1 den Deszensus des Hodens (Zimmermann et al., 1998). In beiden Zelltypen persistiert die SF1-Expression in der adulten Testis (Ikeda et al., 1993).

Bei der ovariellen Entwicklung wird SF1 bis E13.5 exprimiert und dann herunterreguliert. Ab E18 wird es wieder exprimiert und persistiert in Granulosa- und Theka-Zellen des adulten Ovars (Hoivik et al., 2010; Ikeda et al., 1994).

Ebenfalls essentiell ist SF1 bei der Entwicklung der Nebennieren und wird in allen drei Schichten der Nebennierenrinde exprimiert (Ferraz-de-Souza et al., 2011; Hanley et al., 1999). SF1 reguliert zahlreiche Enzyme der Steroidbiosynthese (Keith L. Parker et al., 2002) wie *StAR* (*Steroidogenic acute regulatory protein*) (Sugawara et al., 1996), *Cytochrom P450_{scc}* (Takayama et al., 1994), *3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase* (Leers-Sucheta et al., 1997). *StAR* transportiert Cholesterin in die Mitochondrien, in welchen das Schlüsselenzym *Cyp 450_{scc}* die initiale Reaktion der Steroidogenese katalysiert. Die *3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase* ist ebenfalls notwendig für die Testosteronsynthese.

Ebenso wirkt SF1 zentral auf Gonadotropin-Releasing-Hormone und -Rezeptor sowie LH-/FSH-Produktion und wird im Ventromedialen Hypothalamus und gonadotropen Zellen der Hypophyse exprimiert (Kurrasch et al., 2007; Shinoda et al., 1995).

SF1 beeinflusst somit alle 3 Ebenen der Reproduktionsachse und gilt daher als ein zentraler Regulator des genetischen Netzwerkes der Gonaden-Entwicklung und Funktion (Ferraz-de-Souza et al., 2011).

1.4.3. In vivo Analysen von SF1

XX und XY NR5A1-knockout-Mäuse (NR5A1^{-/-}) haben eine komplette gonadale und adrenale Agenesie sowie weibliche innere Genitale (Luo et al., 1994). Für XY NR5A1-knockout-Mäuse (NR5A1^{-/-}) entspricht dies also einem kompletten phänotypischen Sex Reversal (komplette gonadale Dysgenese mit weiblichen Genitalen) sowie persistierende Müller'sche Strukturen in Form von Uterus, Tuba uterina und oberer Vagina (Luo et al., 1994). Sie versterben innerhalb von 8 Tagen an der adrenalen Insuffizienz (Luo et al., 1994). Eine SF1-Haploinsuffizienz (NR5A1^{+/-}) führt bei Mäusen zu einem variablen Phänotyp mit hypoplastischen Gonaden sowie verminderter adrenaler Stressantwort (Bland et al., 2000).

1.4.4. Korrelierende Phänotypen beim Menschen

Beim Menschen wurden bisher mehr als 130 genetische SF1-Varianten beschrieben, von denen die meisten eine reduzierte Funktion oder einen Verlust der Funktion aufweisen (Robevska et al., 2018). Hauptsächlich korrelieren sie mit einer gonadalen Affektion in Form von XY- und XX-DSD mit variablen Phänotypen abhängig vom Grad der Gonadendysgenese.

Die beschriebenen Phänotypen für Individuen mit XY-DSD sind: komplette und partielle XY-Gonadendysgenese, Hypospadien mit partieller Gonadendysgenese, Infertilität, bilaterale Anorchie und Mikropenis (Achermann et al., 1999, 2002; Allali et al., 2011; Anu Bashamboo et al., 2010; Correa et al., 2004; Coutant et al., 2007; Soardi et al., 2010; F Paris, 2011; Hasegawa et al., 2004; Köhler et al., 2008, 2009; Lin et al., 2007; Lourenço et al., 2009; Mallet et al., 2004; N Camats, 2012; Paliwal et al., 2011; Philibert et al., 2007; Reuter et al., 2007; Tantawy et al., 2012; Tremblay & Viger, 2003; van Silfhout et al., 2009; Warman et al., 2011). Selten treten die XY-DSD in Begleitung einer Nebenniereninsuffizienz auf (Achermann et al., 1999, 2002).

Bei XX-Individuen werden XX-DSD mit unterschiedlichen Schweregraden der ovariellen Entwicklungsstörung beschrieben: Patienten mit prämaturer Ovarinsuffizienz im Sinne einer ovariellen Dysgenese (Lourenço et al., 2009, 2009; N Camats, 2012), testikuläre und ovotestikuläre DSD (Anu Bashamboo et al., 2016), außerdem Androgenexzess mit Hirsutismus (Calvo et al., 2001).

Hauptsächlich handelt es sich bei den beschriebenen SF1-Varianten um heterozygote missense Punktmutationen in kodierenden Sequenzen (Robevska et al., 2018), lediglich drei homozygote Mutationen sind derzeit bekannt (Achermann et al., 2002; F C Soardi, 2010; Zangen et al., 2014). Beschrieben werden außerdem einige Nonsense- und Frameshift-Mutationen (Correa et al., 2004; Hasegawa et al., 2004; Mallet et al., 2004). Deletionen auf dem Chromosom 9, welche das NR5A1-Gen betreffen, führen zu DSD (Barbaro et al., 2011; Schlaubitz et al., 2007; van Silfhout et al., 2009), ebenso wie einige beschriebene Spleißvarianten (Fabbri et al., 2016; Hussain et al., 2016; Robevska et al., 2018).

Während die meisten SF1-Mutationen de novo/sporadisch auftreten, wird in manchen Fällen von XY-DSD eine heterozygote maternale Vererbung (Coutant et al., 2007; Köhler et al., 2008; Lin et al., 2007; Reuter et al., 2007) sowie eine paternale Vererbung beschrieben (Ciaccio et al., 2012; Philibert et al., 2011; Swartz et al., 2017; Yagi et al., 2015).

1.4.5. In dieser Arbeit untersuchte SF1-Mutationen und korrelierende Phänotypen beim Menschen

Für diese Arbeit werden heterozygote SF1-Punktmutationen aus unterschiedlichen funktionellen Bereichen von Patienten mit XY-Karyotyp und einem phänotypischen Spektrum von kompletter Gonadendysgenese, partieller Gonadendysgenese, Infertilität und Hypospadie ausgewählt (Tabelle 2). Dabei werden natürlich vorkommende, neu entdeckte SF1-Mutationen (p.R62C, p.A154T) einer ägyptischen Kohorte mit XY-DSD unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung funktionell untersucht und mit bekannten SF1-Mutationen verglichen.

Tabelle 2: Lokalisation der SF1-Mutationen und Übersicht über Phänotypen der Patienten im Alter der Diagnosestellung sowie deren diagnostische Parameter. WT = Wildtyp, NA = Daten nicht verfügbar, N = Normalwerte, M = männlich, W = weiblich, ↑ erhöht, ↓ erniedrigt. T=Testosteron, LH = Luteinisierungshormon, FSH = Follikelstimulierendes Hormon, AMH = Anti-Müllersches-Hormon, DHEAS = Dehydroepiandrosteronsulfat, GnRH = Gonadotropin-Releasing-Hormon, hCG = humanes Choriongonadotropin, LHRH = luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon

Heterozygote Mutationen	p.G35E p.Gly35Glu c.104 G>A, c.105 C>A	p.R62C p.Arg62Cys c.184 C>T	p.P131L p.Pro131Leu c.392 C>T	p.A154T p.Ala154Thr c.460 G>A Mutter WT, Vater p.Ala154Thr	p.R191C p.Arg191Cys c. c.571 C>T	p.L376F p.Leu376Phe c.1126 C>T
Eltern	WT	NA	NA	NA	NA	WT
Lokalisation	DBD	DBD	HR	HR	HR	LBD
Alter (in Jahren)	1/12	6 6/12	41	4	25	14
Diagnose	Komplette Gonadendysgenese, primäre Nebenniereninsuffizienz	Partielle Gonadendysgenese	Infertilität	Penile Hypospadie	Infertilität	Partielle Gonadendysgenese
Geschlechtszuordnung (M/W)	W	M	M	M	M	W
Gonaden	Streak-Gonaden (1,5x0,4x0,2 cm)	Bilateral kleine, inguinale Hoden (jeweils 8-9 mm Durchmesser)	NA	Beide Testes normal in Skrotum	NA	Bilaterale dysgenetische abdominelle Testes
Externe Genitalien	„phänotypisch weiblich“	Penile Hypospadie, schwer hypoplastischer Penis (1 cm, <-2.5 SDS), hypoplastisches Skrotum	NA	Penile Hypospadie, hypoplastischer Penis (2,5 cm, <-2.5 SDS)	NA	Klitorishypertrophie
Uterus	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Epididymis, Vas deferens	NA	Ja	NA	Ja	NA	NA
Gonadale Diagnostik	T* Nicht messbar LH 1,2->8,6 mIU/ml* (↑), FSH 17,8->38,0 mIU/ml* (↑) <i>(Referenzwerte a)</i>	<i>Mit 4 Monaten:</i> T 0,1->1,8 ng/ml** (↓), LH 0,5->2,2 IU/l*** (N), FSH 1,3->9,1 IU/l*** (↑), <i>Mit 3 Jahren:</i> Inhibin B 15,5 ng/l (↓), AMH: <0,10 ng/ml (↓) <i>(Referenzwerte b, Tanner 1)</i>	Spermogramm: Spermienkonzentration 0 x 10 ⁶ /ml (↓) <i>(Referenzwerte c)</i>	T 0,18(N)->1,6 ng/ml** (↓), LH 0,6 -> 2,1 IU/l*** (N), FSH 1,2 -> 8,7 IU/l*** (N), Inhibin B 70,4 ng/l (N), AMH <20 ng/ml (N) <i>(Referenzwerte b, Tanner 1)</i>	T 5,7 ng/ml (N), LH 10,7 IU/l (↑), FSH 18,8 IU/l (↑), Inhibin B <15 pg/ml (↓), Spermogramm: 0,3 x 10 ⁶ /ml (↓) <i>(Referenzwerte c)</i>	T 2,1 ng/ml** (N), LH** 2,3 IU/L (N) FSH** 35,9 IU/L (↑), Inhibin B <10 pg/ml (↓) <i>(Referenzwerte b, Tanner 4-5)</i>
Adrenale Diagnostik	<i>Mit 2 Wochen:</i> Cortisol 1,2 µg/dl (↓) Aldosteron 5 ng/dl (↓) ACTH 1,665 pg/ml (↓) <i>(Referenzwerte a)</i>	Cortisol N DHEAS N	NA	Keine klinischen Anzeichen einer adrenalen Affektion	NA	Cortisol N DHEAS N
Publikationen	(Achermann et al., 1999)	(Tantawy et al., 2014)	(Bashamboo et al., 2010)	(Tantawy et al., 2014)	(Bashamboo et al., 2010)	(Tantawy et al., 2012)

Referenzwerte aus Originalpublikationen (soweit verfügbar) a, b oder c:

- Gonadotropine sind basal und nach GnRH-Stimulation (*) angegeben. Cortisol: 5-25 µg/dl, Aldosteron: 6-105 ng/dl, ACTH: 10-80 pg/ml.
- Gonadale Diagnostik ist basal, nach hCG-Stimulation (**) und nach LHRH-Stimulation (***) angegeben. Umrechnung zu SI Units: FSH and LH (mIU/ml) x 1 = (IU/l). Basale Testosteronwerte bei Männern mit: Tanner Stadium 1 (<7 Jahre), <0.11–0.65 ng/ml; Tanner Stadium 2–3, 0.62–2.26 ng/ml; Tanner Stadium 4–5, 1.68–6.0 ng/ml. Normale Testosteronwerte nach Stimulation mit HCG 5000 IU/m² hCG, Bestimmung nach 0h: 0.2-4.0 ng/ml und nach 72h: 3.0–10.0 ng/ml. Basales FSH bei Männern: Tanner Stadium 1 (0.5–10 Jahre), <1–1.3 IU/l; Tanner Stadium 2–3 (>10 Jahre), <1–4.0 IU/l; Tanner Stadium 4–5 (>10 Jahre), 1.4–5.1 IU/l. FSH nach LHRH-Stimulation bei Männern: Tanner Stadium 1, <1.1–6.3 IU/l; Tanner Stadium 2–3, <4 IU/l, Tanner Stadium 4–5, 4–15.2 IU/l. Basales LH bei Männern: Tanner Stadium 1, <1–1.5 IU/l; Tanner Stadium 2–3, 1–4.1 IU/l, Tanner Stadium 4–5, 3.4–7.5 IU/l. LH nach LHRH-Stimulation bei Männern: Tanner Stadium 1, <1.4–4.1 IU/l; Tanner Stadium 2–3, 1.5–4.1 IU/l; Tanner Stadium 4–5, 19–37 IU/l. Inhibin B Referenzwerte nach (Andersson, 2000), Inhibin B 74-470 pg/ml. AMH Referenzwerte nach (Aks glaede et al., 2010), in der Kindheit AMH-Median = 105.7 ng/ml (55.3–186.9 ng/ml); präpubertär <9 Jahre 97.58 (44.94–170.52); präpubertär >9 Jahre 81.9 (41.58–155.82); Tanner G2 35.42 (6.44–156.8); Tanner G3 9.24 (3.08–102.76); Tanner G4 6.02 (2.1–15.68) und Tanner G5 6.86 (3.22–17.92).
- Spermogramm: Spermienkonzentration in 10⁶/ml, Normal > 20 x 10⁶/ml; Testosteron: 3.0–10 ng/ml; FSH: 1.0–10.5 IU/l; LH: 0.7–8.0 IU/l; Inhibin B: 80–400 pg/ml.

Die Mutationen sind nachfolgend nach dem Schweregrad der Gonadendysgenese geordnet.

Der Patient mit der heterozygoten p.G35E Mutation ist der als erstes beschriebene Patient mit einer SF1-Mutation, welche als pathogen gewertet wurde (Achermann et al., 1999). Es handelt sich um einen Patienten mit kompletter Gonadendysgenese und adrenaler Insuffizienz. Entsprechend dieses schwer betroffenen Phänotypen sind sowohl Marker der fetalen Leydigzellfunktion (klinische Virilisierung: weibliche Genitale) als auch der postnatalen Leydigzellfunktion (Testosteron, LH/FSH, jeweils basal oder nach Stimulation mit hCG oder LHRH) reduziert bei ausgeprägter Gonadendysgenese (Streak-Gonaden). Ebenfalls ist die adrenale endokrinologische Diagnostik pathologisch. Bei diesem Patienten sind als einzigem persistierende Müller'sche Strukturen vorhanden (Uterus) (Achermann et al., 1999).

Die Patienten mit den Mutationen p.R62C und p.L376F weisen eine partielle Gonadendysgenese auf (Tantawy et al., 2012, 2014). Sie weisen ebenso dysgenetische Gonaden sowie Zeichen einer eingeschränkten embryonalen Leydigzellfunktion auf (weibliche, virilisierte Genitale). Postnatal zeigen sie eine leicht verminderte Leydigzellfunktion. Als Marker der Sertolizellfunktion ist bei beiden Patienten Inhibin B erniedrigt, bei dem Patienten mit p.R62C ist AMH ebenfalls erniedrigt (Tantawy et al., 2012, 2014).

Die Patienten mit den Mutationen p.P131L und p.R191C weisen einen unauffälligen männlichen Phänotyp bei Infertilität auf (Anu Bashamboo et al., 2010). Das Spermogramm zeigt eine verminderte Spermienkonzentration. Bei dem Patienten mit der Mutation p.R191C ist auch Inhibin B reduziert als Marker der verminderten Sertolizellfunktion und damit leichten Gonadendysgenese (Anu Bashamboo et al., 2010). Bei dem Patienten mit der p.A154T Variante liegen ein penile Hypospadie sowie ein hypoplastischer Penis vor (Tantawy et al., 2014). Ebenfalls sind die Testosteron-Werte leicht erniedrigt, sodass von einer leicht eingeschränkten Leydigzellfunktion ausgegangen werden kann. Inhibin B und AMH sind normwertig (Tantawy et al., 2014).

Lediglich bei dem Patienten mit der Mutation p.A154T ist ebenfalls der Vater von der Mutation betroffen. Dieser hat als Vater von 3 Kindern anamnestisch eine normale sexuelle Aktivität und klinisch keinen auffälligen Phänotyp. Bei einem Tannerstadium von V sind Penis und Hodensack ausgewachsen, das Testisvolumen beträgt 25 ml (Tantawy

et al., 2014). Bei p.G35E und p.L376F sind bei den Eltern Wildtyp-Allele nachgewiesen (Achermann et al., 1999; Tantawy et al., 2012).

Im Folgenden ist die Konservierung von den jeweils betroffenen Aminosäuren-Positionen natürlich vorkommender SF1-Mutationen dargestellt, welche bis auf p.A154T alle hochkonserviert sind (Abbildung 3).

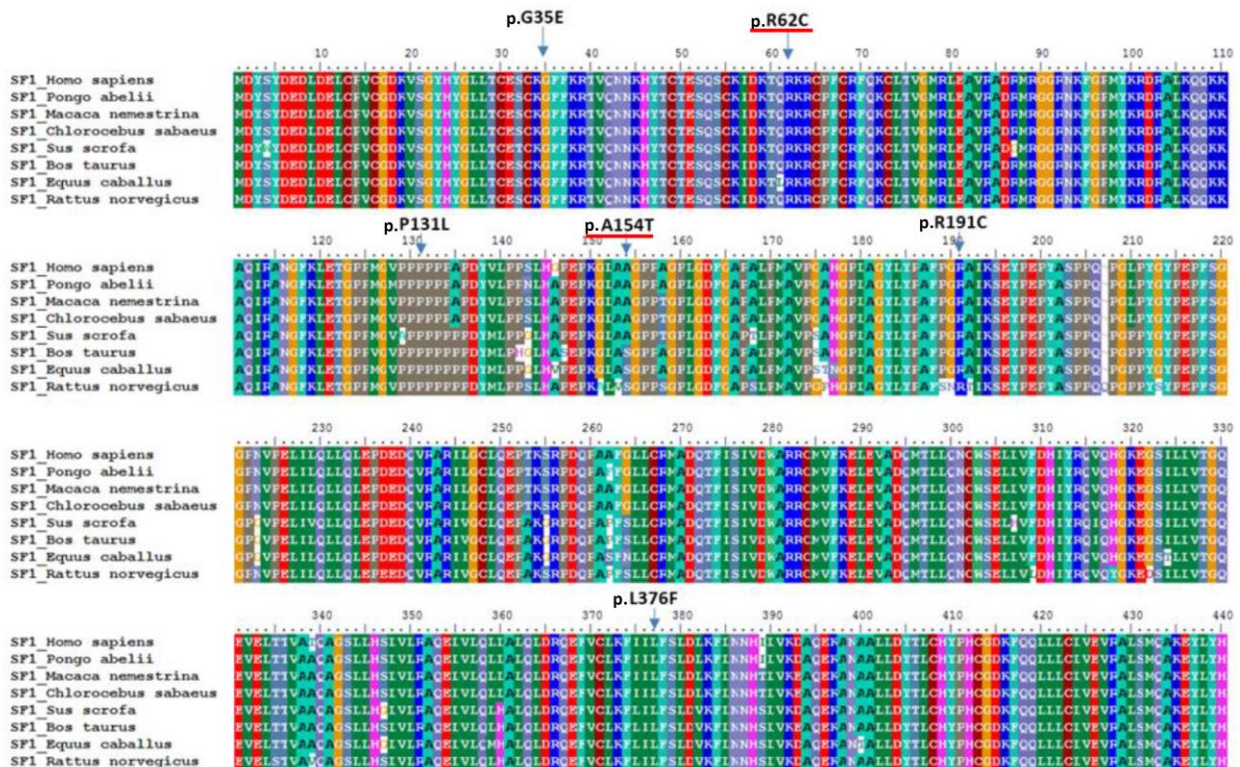


Abbildung 3: Konservierung von SF1 bei verschiedenen Spezies und Lokalisation der Mutationen p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L375F. Die vergleichende Darstellung der Aminosäuresequenzen von SF1 visualisiert die Konservierung und Zusammensetzung von SF1 in verschiedenen Spezies. Zusätzlich sind die Positionen der Mutationen hervorgehoben um Informationen über die Konservierung an den spezifischen Lokalisationen zu erhalten. Die rote Markierung kennzeichnet die neuen Mutationen (p.R62C, p.A154T). Die Mutationen p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.R191C und p.L375F sind hochkonserviert, p.A154T zeigt eine Variation mit Serin. Abbildung erstellt durch Dr. Gunnar Kleinau.

1.5. In vitro Analysen von SF1

Während beispielsweise bei dem AGS eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation für die häufigste Ursache, die 21-Hydroxylase-Defizienz, beschrieben ist, ist diese Korrelation für DSD bisher nicht möglich.

Beim AGS resultieren Mutationen mit einer kompletten Inaktivierung der 21-Hydroxylase-Aktivität in dem schwer betroffenen Phänotyp mit Salzverlustsyndrom (New et al., 2013).

Dahingegen sind eine geringe 21-Hydroxylase-Restaktivität (ca. 2 %) mit einem virilisierten Phänotyp und eine moderate 21-Hydroxylase-Restaktivität (ca. 10-75 %) mit einem milden Phänotyp (normale externe Genitale, ggf. milde Hyperandrogenämie oder asymptomatisch) assoziiert (New et al., 2013). Eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation lässt sich für <50% der untersuchten Patienten zeigen, wobei sich der klinische Schweregrad bei Genotypen des Salzverlustsyndroms und der milden Formen besser vorhersagen lässt als für die virilisierten Formen mit breiter phänotypischer Variabilität (New et al., 2013).

In bisherigen Versuchen in vitro Modelle für die phänotypische Variabilität von XY-DSD zu finden, wurden Analysen von SF1-Mutationen mit steroidogenetischen Promotoren wie CYP11A1 (Gen von *cholesterol side-chain cleavage enzyme*), CYP17A1 (Gen von *Steroid-17 α -Hydroxylase*), HSD3B (Gen von *3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase*), CYP19A1 (Gen von *Aromatase*) oder anderen Promotoren der Geschlechtsdifferenzierung wie AMH, DAX1-Promoter, LH β (luteinizing hormone subunit beta), INSL3 (insulin like 3) und dem SOX9 Enhancer TES/TESCO (testis-specific enhancer of SOX9/core element of testis-specific enhancer of SOX9) durchgeführt (Achermann et al., 1999, 2002; A. Bashamboo & McElreavey, 2010; Eggers et al., 2014; Paris et al., 2011; Knowler et al., 2011; Köhler et al., 2008; Lin et al., 2007; N Camats, 2012; Philibert et al., 2011; Zangen et al., 2014). In den verschiedenen Untersuchungen wurden diese Promotoren uneinheitlich verwendet.

Aufgrund der bekannten pathophysiologischen Mechanismen wurden häufig AMH als Marker der Sertolizellfunktion und CYP11A1 als Marker der Leydigzellfunktion verwendet. Teilweise wurden die Ergebnisse vage mit dem Phänotyp korreliert (Anu Bashamboo et al., 2010; Zangen et al., 2014), obwohl insbesondere für AMH eine Diskrepanz zwischen funktionellem Aktivierungsverlust in vitro ohne Persistenz der Müllersch'en Strukturen in vivo geäußert wurde (Philibert et al., 2011). Insgesamt zeigt sich für CYP11A1 in anderen Publikationen eine relative Reduktion der Aktivierung bei Patienten mit partiellen und kompletten Gonadendysgenesien mit p.G35E oder anderen schwer betroffenen Phänotypen als Referenz. Die Aktivierung divergiert jedoch deutlich im Verhältnis zum Wildtyp je nach verwendeter/m Zellkultur/Testsystem (Ito et al., 2000; Köhler et al., 2008; Lin et al., 2007)

Zuletzt gab es insbesondere für den SOX9 Enhancer TESCO als Marker der Testisdeterminierung Hinweise, dass die Funktionsanalysen in vitro eine Korrelation

zwischen Geno- und Phänotyp erlauben könnten (Paris et al., 2011; Knowler et al., 2011; Philibert et al., 2011; Robevska et al., 2018; Sreenivasan et al., 2018). So zeigen Untersuchungen heterozygoter SF1-Mutationen von Patienten mit der Diagnose einer schweren Gonadendysgenese eine deutlich verminderte SOX9 Enhancer TESCO Aktivierung (Philibert et al., 2011), während beispielsweise ein Patient mit einer heterozygoten p.K63Q SF1-Mutation mit Mikropenis und dem Verdacht auf eine Sertolizellinsuffizienz (verminderte Inhibin B Werte im Alter von 6 Jahren sowie ansteigenden FSH-Werte im Alter von 11 Jahren) eine Reduktion der SOX9 Enhancer TESCO Aktivierung von lediglich 20% aufweist (Paris et al., 2011).

1.5.1. In vitro Modell der Geschlechtsentwicklung

Als zentrale Promoter- und Enhancerregionen der Geschlechtsentwicklung werden für diese Arbeit der SOX9 Enhancer TESCO, CYP11A1 und AMH als in vitro Modell der Geschlechtsentwicklung (Abbildung 4) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Aktivierungsfähigkeit durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutationen untersucht.

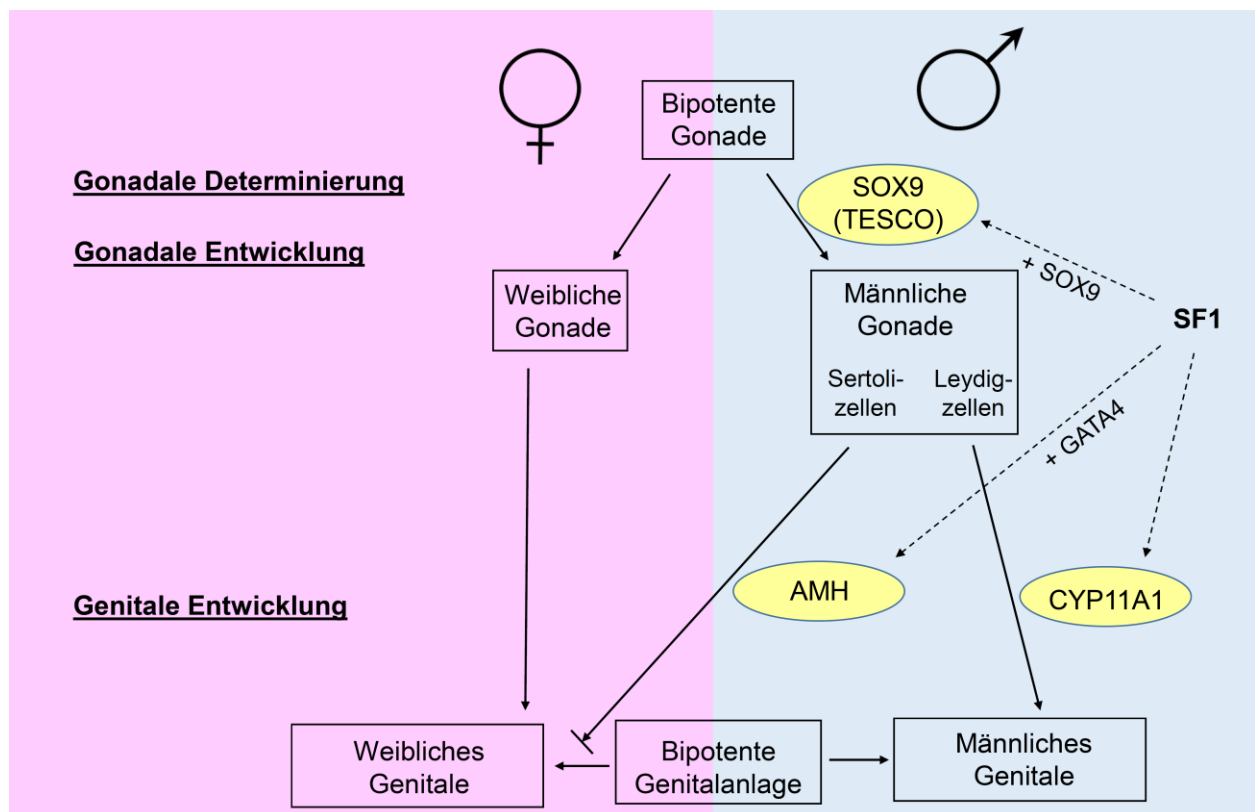


Abbildung 4: Schematischer Überblick der Geschlechtsentwicklung als in vitro Modell für die funktionelle Analyse von SF1 und Interaktionseffekte mit Kofaktoren. Differenzierung der indifferenten Gonade in Testis durch SF1 und Kofaktor SOX9 via SOX9 Enhancer TESCO. Produktion von AMH und damit Rückbildung der Müller'schen

Gänge durch Sertolizellen mit SF1 und GATA4 als relevanten Transkriptionsfaktoren. Leydigzellen produzieren Testosteron SF1-aktiviert via CYP11A1-Promoter, welches die Differenzierung der Wolff'schen Gänge und des Sinus urogenitalis in männliche interne und externe Genitale bewirkt.

Als Testsequenz für die Testisdeterminierung wird der SOX9 Enhancer TESCO ausgewählt, für die Leydigzellfunktion der CYP11A1-Promoter und für die Sertolizellfunktion der AMH-Promoter (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht über zentrale Enhancer und Promotoren der Geschlechtsentwicklung sowie ihrer Funktion in vivo und in vitro.

Faktor	Funktion	Marker für
SOX9 Enhancer TESCO (Core element of testis specific enhancer of SOX9)	Enhancer von SOX9, dem Schlüsselfaktor der frühen gonadalen Determinierung	→ Testis Determinierung
CYP11A1-Promoter (Cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc)	P450scc katalysiert die Konversion von Cholesterol zu Pregnenolon (erster Schritt der Androgen-Biosynthese)	→ Leydigzellfunktion
AMH-Promoter (Anti-müllerian hormone)	AMH verursacht die Regression der Müller'schen Gänge	→ Sertolizellfunktion

Dabei werden auch die Interaktionseffekte mit den relevanten Ko-Transkriptionsfaktoren SOX9 für den SOX9 Enhancer TESCO und GATA4 für AMH untersucht, da ein Verlust dieser Interaktion eine phänotypische Relevanz haben könnte (Coutant et al., 2007). Ebenso wäre möglich, dass ein Funktionsverlust von SF1 partiell durch einen Kofaktor ausgeglichen werden könnte und somit die Penetranz beeinflussen würde (Coutant et al., 2007).

Aufgrund der möglichen Relevanz eines dominant-negativen Effektes soll dies ebenfalls in vitro für den SOX9 Enhancer TESCO untersucht werden (Tremblay & Viger, 2003).

Im Folgenden werden die relevanten Promotoren/Enhancer und Kofaktoren sowie die Hypothese eines dominant negativen Effektes vorgestellt.

1.5.2. Verwendete Promotoren/Enhancer

1.5.2.1. SOX9 Enhancer TESCO

2008 wurde etwa 14 kb upstream von SOX9 ein 3.2 kb großer testis-spezifischer Enhancer von SOX9 „TES“ sowie sein 1.4 kb großes Kernelenement „TESCO“, welcher für die Expression von SOX9 hinreichend ist, identifiziert (Ryohei Sekido & Lovell-Badge,

2008). Durch Chip Assays wurde gezeigt, dass die Initiierung der Expression von SOX9 auf Aktivierungseffekte von TES durch SF1 mit SRY zurückzuführen ist, wohingegen die Aufrechterhaltung der Expression durch Synergieeffekte von SF1 mit SOX9 auf TESCO bedingt wird (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008).

In vitro Untersuchungen mit Luciferase Reporter Assays als Modell der molekulargenetischen Ereignisse in frühen Sertolizellen zeigten, dass TESCO nicht durch SRY oder SOX9 alleine aktiviert werden kann. Während der TESCO Promoter durch SRY oder SOX9 alleine lediglich 1-2-fach über dem Leervektor aktiviert wird und durch SF1 5-fach, zeigen sich für Kotransfektionen von SRY mit SF1 eine 10-fache Aktivierung, für Kotransfektionen von SF1 und SOX9 robuste Daten einer 45-fachen Aktivierung. Eine TESCO-Aktivität ist in SF1-/-Mäusen nicht vorhanden. Die Zusammenschau dieser Ergebnisse suggeriert, dass SF1 ein Schlüsselfaktor der SOX9-Expression darstellt, welcher über den TESCO-Promoter agiert (Jakob & Lovell-Badge, 2011).

1.5.2.2. CYP11A1-Promoter

Cholesterol side-chain cleavage enzyme katalysiert die initiale Reaktion der Steroidogenese (Cholesterol zu Pregnenolon) und ist damit das Schlüsselenzym der Steroidbiosynthese. Sein Gen CYP11A1 wird in Nebennieren und Gonaden lebenslang exprimiert und durch ACTH und Gonadotropine stimuliert (Miller, 1988). Zusätzlich zu dieser hormonellen Regulation beginnt die CYP11A1-Expression bereits früh in der Entwicklung ab E.11 mit SF1 als bedeutendem Transkriptionsfaktor (Ikeda et al., 1994).

1.5.2.3. AMH-Promoter

Das AMH-Gen kodiert für ein Glykoprotein aus 560 Aminosäuren, dessen C-Terminus Homologien zu der TGF- β (transforming growth factor beta)-Familie zeigt. Die AMH-Expression ist sexuell dimorph. In der humanen Testis wird das AMH Protein von den Sertoli-Zellen nach der Geschlechtsdeterminierung ab E12.5 exprimiert und induziert die Regression der Müller'schen Gänge (Sharpe et al., 2003). Im Gegensatz dazu wird AMH nicht in den fetalen Ovarien exprimiert, jedoch in der postnatalen Phase in den Granulosazellen des Ovars (Munsterberg & Lovell-Badge, 1991).

1.5.3. Verwendete Kofaktoren

Dass SF1 sowohl zu adrener als auch gonadaler Affektion führen kann, suggeriert eine unterschiedliche Aktivität in verschiedenen Zelltypen, welche durch weitere gewebespezifische Kofaktoren moduliert sein kann (Nikolova & Vilain, 2006). Für den SOX9 Enhancer TESCO sind die Synergieeffekte von SF1 mit SOX9 in Initiierung und Aufrechterhaltung der SOX9-Expression bereits beschrieben und sind unter „1.5.2.1“ aufgeführt (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008). Ebenfalls ist in in vitro und in vivo Experimenten gezeigt, dass eine funktionelle, synergistische Kooperation von SF1 mit GATA4 zu einer adäquaten Expression von AMH während der Entwicklung der Genitale von Säugetieren beitragen könnte (Tremblay et al., 2001; Tremblay & Viger, 2003).

1.5.3.1. *SOX9 (SRY-related HMG box containing gene 9)*

SOX9 ist ein 65 kDA-Protein, welches ebenso wie SRY zu der HMG-Box-Familie gehört. SOX9 verursacht beim Menschen die kongenitale Skelettmalformation kampomele Dysplasie (Foster et al., 1994). Bei Haploinsuffizienzen kommt es in 75% der Fälle zu XY-DSD mit sex reversal, während Duplikationen zu XX-DSD mit sex reversal führen (Huang et al., 1999).

In Untersuchungen von transgenetischen Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Expression von SOX9 bei XX-Mäusen sex reversal mit Testisentwicklung bedingt (Bishop et al., 2000; Vidal et al., 2001). Eine homozygote Inaktivierung von SOX9 in XY-Mäusen vor dem Zeitfenster der Geschlechtsdeterminierung führt zur Ovarentwicklung (Barrionuevo et al., 2006). Dies lässt vermuten, dass SOX9 das direkte und möglicherweise einzig bedeutende Target von SRY ist (Knower et al., 2011). Im Gegensatz zum Menschen führt bei der Maus eine SOX9^{+/-} Haploinsuffizienz zu normal differenzierten Gonaden (Kobayashi et al., 2005).

Bei Mäusen und Menschen bleibt SOX9 ein Leben lang in den Sertolizellen exprimiert (R. Sekido & Lovell-Badge, 2012). SOX9 wird als Schlüsselregulator der Gonadendeterminierung und -entwicklung betrachtet, da er eine Reihe von Testis-spezifischen Genen aktiviert und den ovariellen Pathway supprimiert (Warr & Greenfield, 2012).

1.5.3.2. GATA4 (GATA binding protein 4)

GATA4 gehört zu der evolutionär konservierten GATA-Familie, welche an die DNA-Sequenz GATA binden und 2 Zinkfinger enthalten. Sie agieren als gewebs- und organspezifische Transkriptionsfaktoren der Entwicklung. GATA4 wird vorwiegend im kardiovaskulären System, den Gonaden und den endodermalen Derivaten exprimiert (Zhou et al., 2012). Zum Zeitpunkt der Gonadenentwicklung in E.13 ist die GATA4-Expression in XY-Gonaden wesentlich höher als in XX-Gonaden (Bouma et al., 2004). Während die GATA4-Expression in den Sertolizellen während der embryonalen Entwicklung aufrechterhalten wird, wird sie in den Granulosazellen herunterreguliert (Viger et al., 1998). GATA4 aktiviert zusammen mit seinem Kofaktor FOG2 die Transkription von SRY (Tevosian et al., 2002) und reguliert mit zahlreichen anderen Transkriptionsfaktoren, unter ihnen ebenfalls SF1, die Expression von AMH, SOX9 und DHH (Tremblay et al., 2001; Manuylov et al., 2007; Val et al., 2003; Zaytouni et al., 2011). Humane GATA4-Mutationen sind mit kongenitalen Herzdefekten (Garg et al., 2003, p. 4) und Gonadendysgenesien assoziiert (Lourenço et al., 2011). Eine 35 kb Deletion, welche das GATA4 Gen betrifft, ist mit 46,XY-DSD mit kompletter Gonadendysgenese und adrenaler Hypoplasie beschrieben (White et al., 2011).

1.5.4. Dominant-negative Effekte bei Haploinsuffizienz

Reduzierte Synergieeffekte mit dem Interaktionspartner GATA4 unklarer Signifikanz können bei der p.G35E-Mutante für den AMH-Promoter gezeigt werden (Tremblay & Viger, 2003). Der Hypothese eines dominant negativen Effektes von mutierten SF1-Proteinen liegt die Vermutung zugrunde, dass die Haploinsuffizienz eines Allels nicht ausreicht, um den Phänotyp zu verursachen. Dagegen sei ein dominant-negativer Effekt durch eine Konkurrenz des SF1-Wildtyps mit der SF1-Mutante, welcher sich ebenfalls auf Synergieeffekte mit Interaktionsfaktoren auswirke, kausal für den Phänotyp (Abbildung 5) (Tremblay & Viger, 2003).

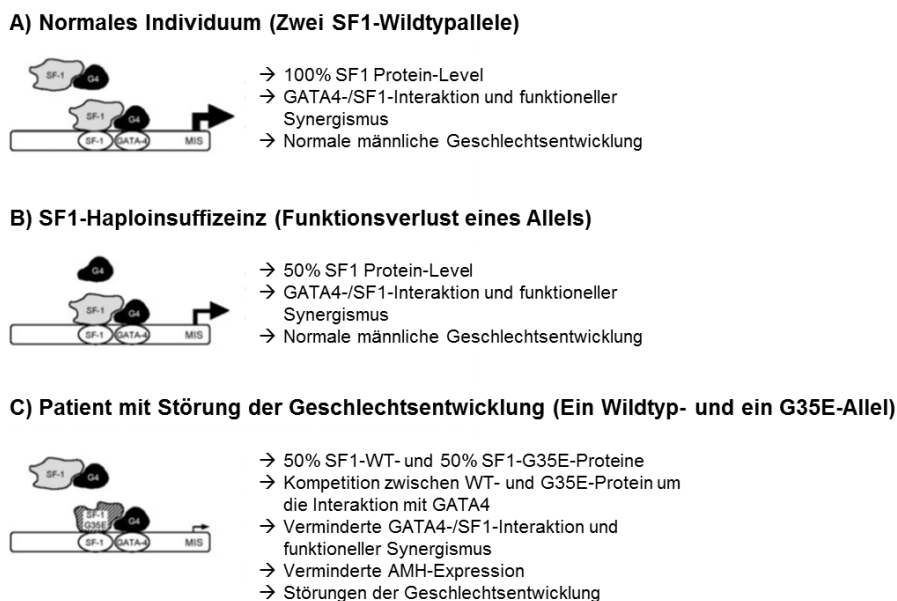


Abbildung 5: Implikation des dominant-negativen Effektes/ GATA4-/SF1-Synergismus in der humanen männlichen Geschlechtsentwicklung. A) Bedeutung der GATA4-/SF1-Transkriptionskooperation für die Regulation des menschlichen MIS-Promoters (Müller-inhibiting-substance, entspricht AMH). B) Bei SF1-Haploinsuffizienz sind die SF1-Expressionslevel zwar reduziert, doch die AMH-Expression reicht für die normale Geschlechtsentwicklung aus. C) Die p.G35E Mutation führt zu einem mutierten SF1-Protein. Dieses kompetiert mit dem SF1-WT-Protein des normalen Allels für die Interaktion mit GATA4 und führt durch einen dominant-negativen Effekt zu einer reduzierten AMH-Expression, welche zu Störungen der Geschlechtsentwicklung führt. Nach (Tremblay & Viger, 2003).

Ein dominant negativer Effekt von heterozygoten Mutationen konnte bislang nicht gezeigt werden (Biason-Lauber & Schoenle, 2000; N Camats, 2012; Tajima et al., 2009; Tremblay & Viger, 2003).

1.6. Zielsetzung der Dissertation

SF1-Mutationen führen zu XY-DSD, deren Phänotypen einen unterschiedlichem Grad der Gonadendysgenese, Virilisierung und residuellen Müller'schen Strukturen aufweisen. Zielsetzung dieser Dissertation ist eine funktionelle Charakterisierung von verschiedenen heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung. Dies erfolgt unter der Fragestellung einer möglichen Korrelation von Genotyp und Phänotyp durch ein optimiertes funktionelles Testsystem (Paris et al., 2011; Philibert et al., 2011; Sreenivasan et al., 2018). Heterozygote missense Mutationen verschiedener Patienten mit einem Spektrum an Phänotypen von Hypospadie bis kompletter Gonadendysgenese

sollen untersucht werden, wobei es sich bei zwei der SF1-Mutationen (p.R62C, p.A154T) um neu diagnostizierte Mutationen handelt. Die Mutationen sind in unterschiedlichen strukturellen Regionen des SF1 Proteins lokalisiert.

Als in vitro Modell der Geschlechtsentwicklung, in dem die funktionellen Auswirkungen der SF1-Mutationen untersucht werden, wird eine Kombination der zentralen Promoter- und Enhancerregionen der Geschlechtsentwicklung gewählt (vgl. Abbildung 4). Ebenfalls werden Interaktionsanalysen mit relevanten Kofaktoren (SOX9 für den SOX9 Enhancer TESCO und GATA4 für den AMH-Promoter) sowie dominant-negative Assays durchgeführt.

Insgesamt liegt dieser Arbeit die Hypothese zugrunde, dass sich die Mutationen der leichten und schwerer betroffenen Patienten mit XY-DSD in einem optimierten in vitro Testsystem im Hinblick auf die funktionelle Einschränkung der veränderten Proteine unterscheiden.

Aus dieser Hypothese ergeben sich die folgenden drei übergeordneten Fragestellungen:

Fragestellung 1: Zellsystem

In den bisherigen Untersuchungen wurden häufig humane embryonale Nierenzellen (HEK, tsa201) verwendet, da sie aus den gleichen Vorläuferzellen wie die Gonaden entstehen (Allali et al., 2011; Anu Bashamboo et al., 2010; Lin et al., 2007; N Camats, 2012; Sreenivasan et al., 2018). Selten wurden Cos- (Fibroblasten der Niere einer afrikanischen grünen Meerkatze [*Chlorocebus aethiops*]), CHO- (Chinese Hamster Ovary), Leydig (TM3) oder Teratokarzinoma-Zelllinien (neuronalen Vorläuferzellen) verwendet (Knower et al., 2011; Philibert et al., 2007; Robevska et al., 2018).

In dieser Arbeit sollen die funktionellen Assays in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) im Vergleich zu murinen Sertolizellen (TM4) durchgeführt werden mit den beiden folgenden Fragen:

- Sind die Ergebnisse der funktionellen Analysen in beiden Zelllinien konstant?
- Können die TM4 Zellen die physiologischen Gegebenheiten der Geschlechtsentwicklung besser nachstellen und sind dadurch sensitiver für funktionelle Unterschiede?

Fragestellung 2: Neue Mutationen

In einer ägyptischen Kohorte aus Patienten mit XY-DSD wurden neue SF1-Mutationen gefunden. Von diesen Mutationen sollen die Mutationen p.R62C und p.A154T, die mit unterschiedlichem Phänotyp beschrieben sind, in dieser Arbeit zum ersten Mal funktionell charakterisiert werden. Während der Patient mit der Mutation p.R62C eine partielle Gonadendysgenese aufweist mit verminderter Sertolizellfunktion und verminderter fetaler und postnataler Leydigzellfunktion, wird bei dem Patienten mit der p.A154T Variante eine penile Hypospadie beschrieben (Tantawy et al., 2014).

Zu diesen beiden neu diagnostizierten Mutationen sollen die beiden folgenden Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich signifikante Aktivierungsunterschiede der relevanten Promotoren der Geschlechtsentwicklung feststellen im Vergleich zum Wildtyp?
- Ist die Mutation p.A154T des gering ausgeprägten Phänotyps der Hypospadie mit einem fertilen Vater, welcher ebenfalls Träger der Mutation ist, überhaupt funktionell relevant?

Fragestellung 3: Genotyp-Phänotyp

Die gefundenen neuen Mutationen sollen im Vergleich zu bekannten, bereits beschriebenen heterozygoten Mutationen mit unterschiedlich ausgeprägtem Phänotyp untersucht werden. Die Phänotypen werden hierfür nach dem Schweregrad der Gonadendysgenese in verschiedene Kategorien eingeteilt (Tabelle 4, vgl. auch Tabelle 2).

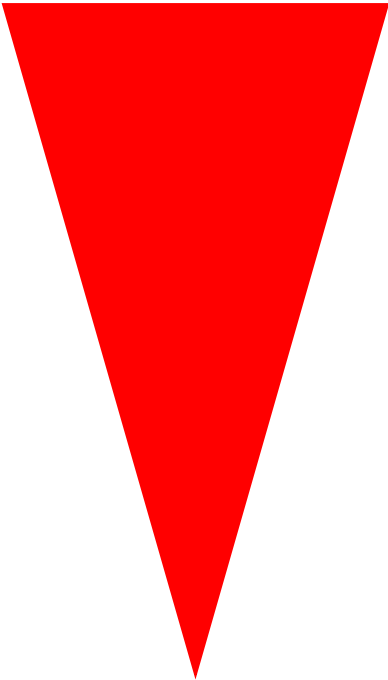
Folgende Fragen sollen zu diesen Mutationen bzw. Phänotypen beantwortet werden:

- Gibt es signifikante Unterschiede in den Aktivierungsniveaus der relevanten Promotoren in den verschiedenen Kategorien (Schweregrad der Gonadendysgenese)?
- Korrelieren diese signifikanten Unterschiede gegebenenfalls mit den klinischen Phänotypen? Korrelieren die signifikanten Unterschiede quantitativ mit den klinischen Markern der Gonadendysgenese/Sertolizellfunktion (SOX9 Enhancer TESCO) bzw. Leydigzellfunktion (CYP11A1) mit den verschiedenen Kategorien (Schweregrad der Gonadendysgenese)? Haben die Mutationen von Patienten mit schwerer Gonadendysgenese z.B. eine geringere SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung als von Patienten mit partieller oder leichter Gonadendysgenese? Haben die Mutationen von Patienten mit geringer Virilisierung im Sinne einer verminderten

Leydigzellfunktion eine niedrigere CYP11A1-Aktivierung als die Mutationen von Patienten mit ausgeprägter/normaler Virilisierung? Ist der AMH-Promotor aussagekräftig in Bezug auf persistierende Müller'sche Strukturen?

- Lassen sich diese Unterschiede in den Aktivierungsniveaus der relevanten Promotoren durch Kotransfektionen mit Kofaktoren in den verschiedenen Kategorien sensitiver messen?
- Sind die Ergebnisse der bereits analysierten Mutanten konstant zu den bisherigen Publikationen?

Tabelle 4: Phänotypen und Schweregrade der Gonadendysgenese der beschriebenen Mutationen. Schweregrade der Gonadendysgenese absteigend aufgelistet.

Grad der Gonadendysgenese	Mutationen und Phänotyp
	Komplette Gonadendysgenese (p.G35E) mit deutlich eingeschränkter embryonaler und postnataler Leydig-, als auch Sertolizellfunktion sowie als einzigem Phänotyp persistierende Müller'sche Strukturen
	Partielle Gonadendysgenese (p.R62C, p.L376F) mit eingeschränkter Sertolizellfunktion sowie eingeschränkter embryonaler und postnatal leicht verminderter Leydigzellfunktion
	Infertilität (p.P131L und p.R191C) im Sinne einer leichten Gonadendysgenese mit verminderter Sertolizellfunktion
	Hypospadie (p.A154T)

2. Material und Methoden

2.1. Geräte und Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Hersteller

Bezeichnung der Geräte	Hersteller
DNA-Sequenzierer: Genetic Analyzer 3130xl, ABI PRISM	Applied Biosystems®
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH
Geldokumentationssystem GeneFlash	Syngene
Gelkammern Agargel Mini	Biometra
Inkubatoren <ul style="list-style-type: none"> ○ Brutschrankinkubator BB6220 ○ Großraum-Schüttelinkubator Certomat® BS-1 ○ Inkubator Typ B 6030 ○ Schüttelinkubator Vari-Shaker 	Heraeus Instruments Braun Heraeus Instruments Dynatech
Inverses Auflichtmikroskop Axiovert 10	Zeiss
Kreisschüttler Vari-Shaker	Dynatech
Mini Power Pack	Biometra
Multitechnologie Mikroplattenleser Mithras LB940	Berthold Technologies
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo
Photometer <ul style="list-style-type: none"> ○ BioPhotometer ○ Spectrophotometer Nanodrop ND1000 	Eppendorf Peqlab
Pipetten Eppendorf Research	Eppendorf
Pipettierhilfen <ul style="list-style-type: none"> ○ Accu-jet® pro ○ E1-ClipTip ○ HandyStep ○ Multipipette® M4 	Brand Thermo Scientific Brand Eppendorf
Sterilwerkbank Holten HB 2448 LaminAir	Heraeus Instruments
Thermocycler <ul style="list-style-type: none"> ○ Mastercycler ep gradient S ○ Thermocycler G-Storm 	Eppendorf Gene Technologies
UV-Tisch	Vilber Lourmat GmbH
Vakuum-Pumpe Model No. 2522C-02	Welch
Vortex-Genie 2	Mo Bio
Waagen	

<ul style="list-style-type: none"> ○ LC 2200 ○ Präzisionswaage CP 	Sartorius Sartorius
Wasseranlage Millipore Milli-Q® Biocel	Merck Millipore
Zentrifugen <ul style="list-style-type: none"> ○ SORVAKK RC 6 Plus ○ Tischzentrifuge 5417R ○ Minizentrifuge Galaxy mini 	Thermo Scientific Eppendorf VWR

2.1.2. Chemikalien

Kommerziell erworbene Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Verwendete kommerziell erworbene Chemikalien und Reagenzien sowie Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Roth GmbH, BD
Agarose	Roth GmbH
Borsäure	Neolab
Bromphenolblau	Merck
Cutsmart Buffer (für Restriktionsenzyme)	New England Biolabs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
DNA Ladder 1 kb	Invitrogen
Ethanol 96%	Roth GmbH
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Calbiochem
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG
FUGENE® 6 Transfection Reagent	Promega
Glucose	Roth GmbH
Glycerol (100%)	Eurofins MWG Operon
Hefeextrakt	Roth GmbH, BD
HPLC-Wasser Gradient Grade, Baker HPLC Analyzed'	J.T. Baker
Kaliumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Natriumchlorid	Roth GmbH, Sigma
Magnesiumsulfat	Merck
Non-essential Amino Acids (NEA)	Biochrom
NZ-Amine	Sigma Life Science
PBS Dulbecco (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , wenig Endotoxin)	Biochrom AG
Pferdeserum	Biochrom AG
Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml)	Biochrom AG

Tris	Roth GmbH
Trypton/Pepton aus Casein	Roth GmbH
Xylencyanol	Merck

Kommerziell erworbene Enzyme

Tabelle 7: Verwendete kommerziell erworbene Enzyme und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
<i>Bam</i> HI (20000 U/ml)	New England Biolabs
<i>Dpn</i> I restriction enzyme (10 U/μl)	New England Biolabs
<i>Hinc</i> II restriction enzyme (10000 U/ml)	New England Biolabs
<i>Pfu</i> -Turbo DNA Polymerase (2.5 U/μl), 10x cloned <i>Pfu</i> Reaction Buffer	Agilent Technologies

Das für die Experimente verwendete MQ-Wasser wird mit der Wasseranlage Millipore Milli-Q® Biocel aufbereitet. HPLC Wasser wird nach dem Standard von „Water HPLC Gradient Grade Baker HPLC Analyzed“ (J.T. Baker ®) erworben.

Kommerziell erworbene Reagenziensysteme:

Tabelle 8: Verwendete kommerziell erworbene Reagenziensysteme und Hersteller

Bezeichnung	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems™
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Promocell
Plasmid DNA Purification, NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel

Verwendete Lösungen und Puffer

Tabelle 9: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
dNTP-Mix, 50 mM (Invitrogen)	50 mM → wurde in HPLC-Wasser verdünnt auf 10mM
Ethanol	96% → wurde in HPLC-Wasser auf 70% (v/v) verdünnt
Loading Dye für Agarosegele	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05% (w/v) Bromphenolblau • 0,05% (w/v) Xylencyanol • 50% (v/v) 1XTBE • 50% (v/v) Glycerin
5M NaOH	<ul style="list-style-type: none"> • 5 M Natriumhydroxid

	<ul style="list-style-type: none"> • MQ-Wasser
5XTBE-Stocklösung (Laufpuffer für Agarosegele)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Borsäure • 0,5 M Tris • 10 mM EDTA • MQ-Wasser • pH 8,0 (mit 5M NaOH)

Verwendete Medien

Bakterienkultur

Die Bakterienkulturmedien (Tabelle 10) werden bei einer Temperatur von 120°C 30 Minuten dampfsterilisiert. Die Zugabe der Antibiotika erfolgt nach Abkühlung auf Raumtemperatur.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Medien in der Bakterienkultur

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5% (w/v) Hefeextrakt • 1% (w/v) Trypton/Pepton aus Casein • 1% (w/v) Natriumchlorid • MQ-Wasser • pH 7,4 (5M NaOH)
LB-Medium mit Ampicillin	<ul style="list-style-type: none"> • LB-Medium • 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agarplatten	<ul style="list-style-type: none"> • LB-Medium • 1,5% (w/v) Agar
LB-Agarplatten mit Ampicillin	<ul style="list-style-type: none"> • LB-Agarplatten • 100 µg/ml Ampicillin
SOB-Medium (Ausgangsmedium für SOC-Medium)	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05% (w/v) Natriumchlorid • 0,5% (w/v) Hefeextrakt • 2% (w/v) Trypton/Pepton aus Casein • 2,6 mM Kaliumchlorid • 20 mM Magnesiumchlorid • MQ-Wasser • pH 7,0 (mit 5M NaOH)
SOC-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • SOB-Medium • 20 mM D-Glukose (steril filtriert)
NZY-Medium	<ul style="list-style-type: none"> • 1% (w/v) NZ-Amine • 0,5% (w/v) Hefeextrakt • 0,5% (w/v) Natriumchlorid • 22 mM Glukose

	<ul style="list-style-type: none">• 12,5 mM Magnesiumchlorid• 12,5 mM Magnesiumsulfat• MQ-Wasser• pH 7,0 (mit 5M NaOH)
NZY-Medium mit Ampicillin	<ul style="list-style-type: none">• NZY-Medium• 100 µg/ml Ampicillin
NZY-Agarplatten	<ul style="list-style-type: none">• NZY-Medium• 1,5% (w/v) Agar

Zellkulturmedien

Die Zellkulturmedien (Tabelle 11) werden unter der Sterilwerkbank hergestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der verwendeten Medien in der Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
Vollmedium für HEK293-Zellen	<ul style="list-style-type: none">• 500 ml MEM Earle`s (mit stabilem Glutamin und 2,3 g/l NaHCO₃), Biochrom AG• 5% (v/v) fetales Kälberserum• 0,5% (v/v) NEA
Vollmedium für TM4-Zellen	<ul style="list-style-type: none">• 500 ml DMEM:F-12 Medium (mit 2.5 mM L-Glutamin, 15 mM HEPES, 0,5 mM Natriumpyruvat und 1200 mg/l Natriumbikarbonat), ATCC®• 5% (v/v) Pferdeserum• 2,5% (v/v) FKS
Transfektionsmedium	<ul style="list-style-type: none">• OPTIMEM I reduziertes Serum Medium (ohne Phenolrot), Gibco
Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none">• 40% (v/v) Vollmedium• 10% (v/v) DMSO• 50% FKS

Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien werden von folgenden Firmen erworben: Biozym, Brand, BD, Eppendorf, Sarstedt (Nürnbrecht, DE), Thermo Scientific

2.1.3. Bakterienstämme und Zelllinien

Die folgenden Bakterienstämme und Zelllinien werden in dieser Arbeit verwendet, beide Zelllinien exprimieren SF1 (Pezzi et al., 2004).

Bakterienstämme

- MAX Efficiency® DH5α™ (Invitrogen)
- XL1-Blue Supercompetent Cells (Agilent Technologies)

Zelllinien

- HEK293 (humane embryonale Nierenzellen)
 - Herkunft: Prof. Luca Persani, Istituto Auxologico Italiano, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Milano, Italien
 - Charakteristika: Transformationsprodukt einer humanen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Fragmenten des humanen Adenovirus. Die Zellen wachsen adhärent und zeichnen sich durch eine gute Transfizierbarkeit aus.
- TM4-Zellen (Mäuse-Sertolizellen)
 - Herkunft: ATCC® CRL-1715™, Prof. Dr. rer. nat. Jörg Gromoll, Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Universitätsklinikum Münster, Deutschland
 - Charakteristika: Sertolizellen 11-13 Tage alter männlicher Mäuse. Die Zellen weisen eine epitheliale Morphologie auf und wachsen adhärent.

2.1.4. Plasmide

Für die Dissertation werden diverse Plasmide verwendet, welche nachfolgend in den Kategorien Expressions- und Reportervektoren aufgelistet sind (Tabelle 12, Tabelle 13).

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Expressionsvektoren

Bezeichnung	Insert	Spezies	Plasmide	Features/ Tags	Resistenz	Insertionsort	Herkunft
hSF1-WT	hNR5A1, WT	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	Bashamboo et al.
hSF1-G35E	hNR5A1, p.G35E, c.104 G>A, c.105 C>A	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSF1-R62C	hNR5A1, p.R62C, c.184 C>T	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSF1-P131L	hNR5A1, p.P131L, c.392 C>T	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSF1-A154T	hNR5A1, p.A154T, c.460 G>A	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSF1-R191C	hNR5A1, p.R191C, c.571 C>T	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSF1-L376F	hNR5A1, p.L376F, c.1126 C>T	Human	pcDNA3	N-terminal 2xMyc Tag	Ampicillin	NheI/EcoRI	In dieser Arbeit beschrieben
hSOX9-WT	hSOX9, WT	Human	pcDNA3	keine	Ampicillin	NheI/EcoRI	Bashamboo et al.
hGATA4-WT	hGATA4, WT	Human	pcDNA3	keine	Ampicillin	Hind III/Xho	In dieser Arbeit beschrieben
hGATA4- A280T	hGATA4, p.A280T, c.838 A>G	Human	pcDNA3	keine	Ampicillin	Hind III/Xho	Dame et al.
pcDNA3- Leervektor	Leervektor	entfällt	pcDNA3	keine	Ampicillin	keine	Invitrogen
hMC4R	hMC4R (1009 bp)	Human	pcDNA3	YFP	Ampicillin	EcoRI/ SpeI	Biebermann et al.
pCS2- Leervektor	Leervektor	entfällt	pCS2+	keine	Ampicillin	keine	Bashamboo et al.

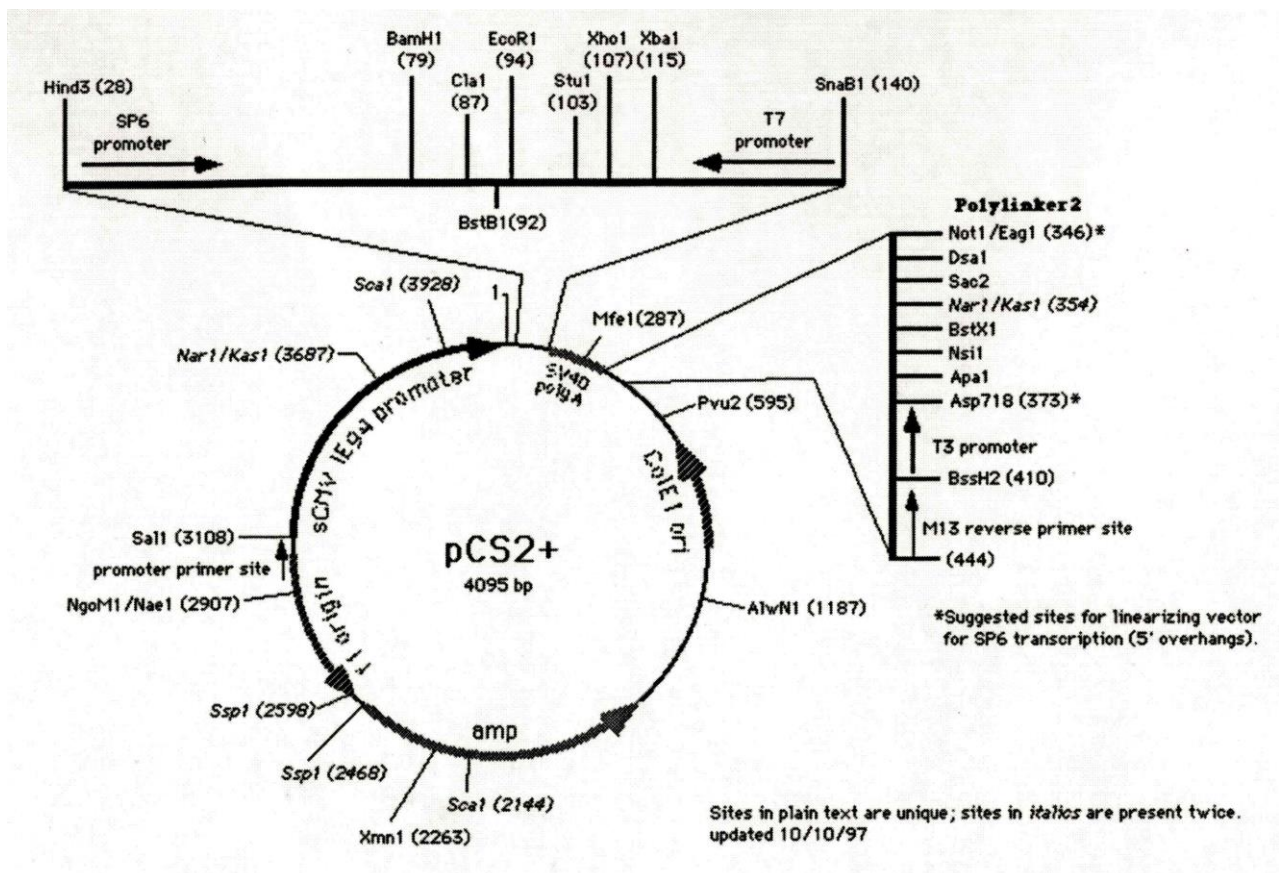
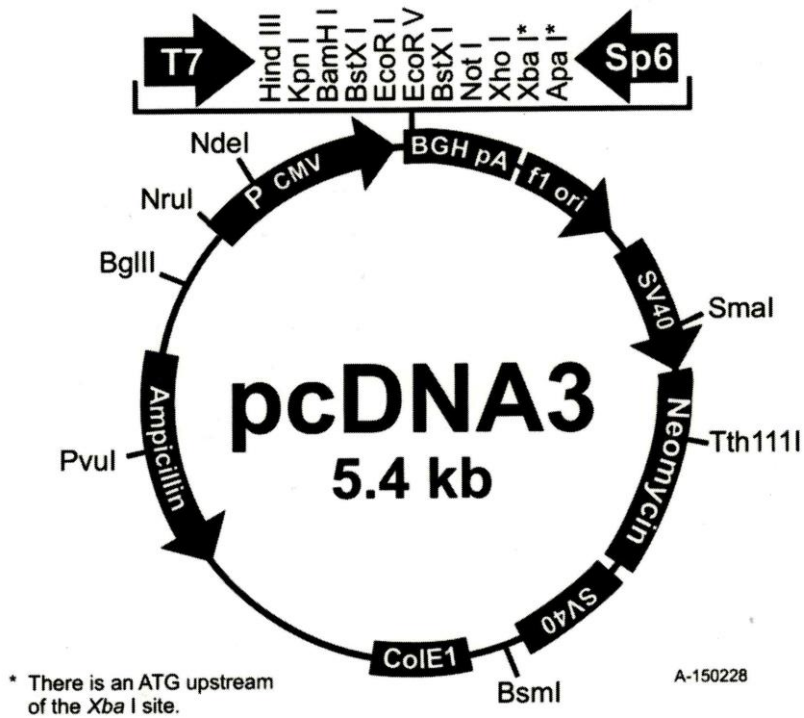
Tabelle 13: Übersicht über die verwendeten Reportervektoren

Bezeichnung	Insert	Spezies	Plasmide	Features/	Resistenz	Insertionsort	Herkunft
mTESCO	mTESCO	Maus, Lampyridae (Firefly Luciferase)	pGL4.26,	Luc2, minP, Hygro	Ampicillin, Hygro	XhoI/Bgl II	Bashamboo et al.
hAMH360	hMIS360	Human, Lampyridae (Firefly Luciferase)	pGL3-basic	keine	Ampicillin	KpnI/Hind III	Bashamboo et al.
mCYP11A1	mCYP11A1 (-81 bis +42)	Maus, Lampyridae (Firefly Luciferase)	pA3	keine	Ampicillin	NA	Bashamboo et al.
pRL red	Renilla Luciferase WT	Renilla reniformis (Renilla Luciferase)	pRL-CMV	keine	Ampicillin	NheI/XbaI	Bashamboo et al.

Das 1.4 kb Kernelement TESCO des SOX9 Enhancers TES, welcher für die Expression von SOX9 hinreichend ist, weist 2 Bindungsstellen für SF1 auf (Ryohei Sekido & Lovell-Badge, 2008). Der verwendete murine CYP11A1-Promoter (Position -81 bis +42) (Achermann et al., 1999; Lourenço et al., 2009) weist eine inverse SF1-Bindungsseite an der Position -46/-38 auf und ist für die basale CYP11A1 Expression in allen steroidogenetischen Geweben verantwortlich (Shih et al., 2011). Die Bedeutung dieser Promoterregion wurde *in vitro* und *in vivo* bestätigt, eine Mutation der proximalen Bindungsseite resultierte in einem kompletten Verlust der Genexpression in transgenetischen Mäusen (Hu et al., 2001). Der gesamte AMH-Promoter besitzt eine Länge von über 3-kb. Für den Beginn der AMH-Expression im frühen fetalen Leben ist der in dieser Arbeit verwendete, proximale 370-bp Promoter ausreichend (Beau et al., 2001). Für die in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktoren sind Bindungsstellen für SF1 (-92bp und -218bp), SOX9 (-141bp) und GATA4 (-86 bp) beschrieben, die meisten davon ab 281 bp vor dem AMH-Gen (Oppelt et al., 2005).

Die Vektorkarten der in den Hauptversuchen verwendeten Expressionsvektoren sind im Folgenden aufgeführt (Abbildung 6).

Abbildung 6: Vektorkarten pcDNA3 und pCS2+



2.1.5. Primer

Die Primer werden bei Sigma-Aldrich erworben. Anbei sind die verwendeten Primer nach Sequenzierungsprimern der Inserts und Vektoren sowie die Mutagenese-Primer aufgelistet (Tabelle 14, Tabelle 15, Tabelle 16). Die Referenzsequenzen sind ebenfalls im Folgenden aufgeführt.

Tabelle 14: Sequenzierungsprimer der Inserts NR5A1 und GATA4

Gen	Referenzsequenz	Primer Name	Primer Sequenz
NR5A1	NM_004959	c1_huSF1	GGAAGCCGTGCGCGCTGACCGTAT
		c1bis_huSF1	AGCCATTGGCCCGAATCTGTGCCT
		c_huSF2	CATCAAGTCTGAGTACCCGGAGCCT
		c_huSF3	AGCTGGAGGTGGCCGACCAGATGAC
GATA4	NM_002052	c1_huGATA4	GGGCCTGTCCTACCTCCAGG
		c1bis_huGATA4	CGCCTCCGGACGCAGAGCCC
		c2_huGATA4	CGGCCCTTCGACAGCCCGG
		c3_huGATA4	CCAAACCAGAAAACGGAAGC

Tabelle 15: Sequenzierungsprimer der Vektoren

Plasmid	Primer Name	Primer Sequence
pcDNA3	T7	TAATACGACTCACTATAGGG
PCS2	SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

Tabelle 16: Verwendete Mutageneseprimer

Gen	Mutation	Oligonukleotid-Sequenz	
		forward	reverse
hNR5A1	p.G35E	ACGTGTGAGAGCTGCAAGGAATTCT TCAAGCGCACG	CGTGCCTTGAAGAATTCCTT GCAGCTCTCACACGT
	p.R62C	GCAAGATCGACAAGACGCAGTGCAA GCGCTGTCCCTTC	GAAGGGACAGCGCTTGCCTG CGTCTTGTGATCTTGC
	p.P131L	GATGGGGGTGCCCCCGCTGCCCCC TCCCGCACCGG	CCGGTGCGGGAGGGGGCAGC GGGGCACCCCATC
	p.A154T	CTGAGCCCAAGGGCCTGGCCACCG GTCCACCTGCTGGGC	GCCAGCAGGTGGACCGGTG GCCAGGCCCTTGGGCTCAG
	p.R191C	CCTGCCTTTCCTGGCTGTGCCATGA AGTCTG	CAGACTTGATGGCACAGCCAG GAAAGGCAGG
	p.L376F	GTCTGCCTCAAGTTCATCATCTTCTT CAGCCTGGATTTGAAG	CTTCAAATCCAGGCTGAAGAA GATGATGAACTTGAGGCAGAC
hGATA4	p.T280A	GACCACCACCACCACGCTGTGGCGC CG	CGGCGCCACAGCGTGGTGGT GGTGGTC

Referenzsequenz NR5A1 (NM_004959):

1 ggaggacgga cggacagggc cagcctgctg tccggctgcc gcccgccgtg gtgtgagggg
61 gtttctgctc acccacagtc gccaccgtcc cacctgggct gccggagcct cccctggac
121 ccctggtgcc cactgccacc ctcatccggg gtgagagcgc tgcttccgct tcgaggacgc
181 cgcgggcatg gactattcgt acgacgagga cctggacgag ctgtgccccg tgtgaggggg
241 caaggtgtcc ggctaccact acggactgct cacgtgtgag agctgcaagg gcttcttcaa
301 gcgcacggtg cagaacaaca agcactacac gtgcaccgag agccagagct gcaagatcga
361 caagacgcag cgcaagcgct gtccttctg ccgcttccag aatgcctga cggtggggat
421 gcgcctggaa gccgtgctgc ctgaccgtat gagggggtggc cggaacaagt ttgggcccgat
481 gtacaagcgg gaccggggccc tgaacagca gaagaaggca cagattcggg ccaatggctt
541 caagctggag acagggcccc cgatgggggt gcccccgccg cccctcccg caccggacta
601 cgtgctgcct cccagcctgc atgggcctga gcccaagggc ctggcccgcc gtccacctgc
661 tgggcccactg ggcgactttg gggccccagc actgcccagc gccgtgcccg gtgcccacgg
721 gccactggct ggctacctct acctgcctt tctggccgt gccatcaagt ctgagtacc
781 ggagccttat gccagcccc cacagcctgg gctgccgtac ggctaccag agccttctc
841 tggagggccc aacgtgcctg agctcatcct gcagctgctg cagctggagc cggatgagga
901 ccaggtgctg gcccgcatct tgggctgcct gcaggagccc accaaaagcc gccccgacca
961 gccggcggcc ttcggcctcc tgtgcagaat ggccgaccag accttcatct ccatcgtgga
1021 ctgggcacgc aggtgcatgg tcttcaagga gctggagggt gccgaccaga tgacgctgct
1081 gcagaactgc tggagcagc tgctggtgtt cgaccacatc taccgccagg tccagcagc
1141 caaggagggc agcatcctgc tggtcaccgg gcaggagggt gagctgacca cagtggccac
1201 ccaggcgggc tcgctgctgc acagcctggg gttgcccggc caggagctgg tgctgcagct
1261 gcttgccgtg cagctggacc ggcaggagtt tgtctgcctc aagttcatca tctcttcag
1321 cctggatttg aagttcctga ataaccacat cctggtgaaa gacgctcagg agaaggccaa
1381 gcggccctg cttgactaca cctgtgcca ctaccgcac tgcggggaca aattccagca
1441 gctgctgctg tgccctggtg aggtgcccgg cctgagcatg caggccaagg agtacctgta
1501 ccacaagcac ctgggcaacg agatgccccg caacaacctg ctcatcgaaa tgctgcaagc
1561 caagcagact tgagcctggg ccggggggcg ggccgggact gggggcggga ctggggggcg
1621 ggccctggcg gggccgcagc cacaccgctg gctccgcatg gttcattttc tgatgccac
1681 cgaggagccc cagccccgtc ccagaggccg ctgcccctga gttctgacac tgtgtgtttg
1741 ggaaggtggg tgaggctggg cagggcctgg cggagggtga gtggcactg gcactgctc
1801 gctgcttggg gtgccccaaag gagggtgctg ttaaccacc gccccgcccc ctccctgctc
1861 ccagctctct ctccctggag ctgaagcctg cagggtccggg gaggaggttc gggattccct
1921 ggtgggcctc gacgtccctt ggatcagagg tcatcccttc ctctctcct ggaaacagac
1981 agggagaagt tgagcaggta tcaactaggg gaggagagag ggtctccagt gttccccca
2041 tagagaccag gaggagagc ctctgttttg taaactaagg ataaccgagt ttgctaaatt
2101 gagaggggct attgggccc agaggacact aggagactgg ttaggacaaa aagaccttct
2161 ccctagccct tctacccac ctgacctctg caagaggggg cattgataca tcatcgggaa
2221 aaaactttgc tccaggcatc actgattccc tctcccacc aaggagaacg tttgttacia
2281 tcgacatcct agccccacc agagggtggc ctcccaggct ggtatttatc tgcaaggttg
2341 tagtcaagag gtttttctcc ccgctttttg tttttaagct tctagacact cctgaaatg
2401 tgtgtgtgat ggaggggaagg ggacagattt gaggactgaa gctggggcct ggggattgcc
2461 actaagtaca gctgacggtt tctccccgga cactcgccta ctaagtacc ttgggggtgt
2521 gctgggtcat tactttctgag cccagcccc aatccagaga agcgtgttg cccgccctcc
2581 acccactagg tgaacagcag gatgccctgt tggggcctt aggtctctgt gggtgggaat
2641 gcaagtgaac ttgggagggg gcacgggccc gtagatcagg gatagcgtg ttgatcccct
2701 ctctgtggct ccaaccggtt gggctccttg ctgcaaacc atgaagctgg cctcagctc
2761 cctgaccccc tctcctaggt catgaaggac actctgcagg gtgaagcacc agggagaggc
2821 ctggctgtc tctgtcccc gggggggtgc ctgctgtccg tcccgtttc atgttactgt
2881 tgcagcttgt gctgagcctg ccagttgga ggagactgg caccctgcc tctgctcc
2941 gcctcccgc caccctgtct cagtaoctcc cctccccgcc ccctgaaaca tgtgcccctg
3001 ccaaggcgg agaccacag ccctgaaacg agaagtgcc ttaaggatca cccagcccc
3061 cacagccctg gaataaatt cgcaattagt ttcca

Referenzsequenz GATA4 (NM_002052):

1 agtcagcgcc ctagggccga gttgctgggc cggggaccgc agccgcgagc tggggacttg
61 gaggcgcccg gcgcaggggc cgcgagaggc ttcgtcgccg ctgcagctcc gggggctccc
121 aggggagcgt gcgcggaacc tccaggccca gcaggacccc ggctgcggcg aggaggaagg
181 agccagccta gcagcttctg cgctgtggc cgcgggtgtc ctggaggcct ctcggtgtga
241 cgagtggggg acccgaaggc tegtgcgcca cctccaggcc tggacgctgc cctccgtctt
301 ctgccccaa taggtgcgce ggacctcag gccctggggg gaattcagct gtcctacat
361 cagcttccgg aaccaccaa aattcaaat gggattttcc ggagtaaaaca agagcctaga
421 gccctttgct caatgctgga ttaatacgt atataatattt aagcgagttg gttttttccc
481 ctttgatattt tgatcttgcg gacagttcct cccacgcata ttatcgttgt tgccgtcgtt
541 ttctctcccc gcgtggctcc ttgacctgcg agggagagag aggacaccga agccgggagc
601 tcgcagggac catgtatcag agcttgcca tggccgcaa ccacgggccg cccccgggtg
661 cctacgaggg gggcggcccc ggcgccttca tgcacggcgc gggcgcgcg tctcgcagc
721 tctacgtgcc cacaccgcgg gtgcctcct ccgtgctggg cctgtcctac ctccaggcg
781 gaggcgccgg ctctgcgccc ggaggcgcc cgggcggcag ctccggtggg gcccgctctg
841 gtgccccggc cgggaccag cagggcagcc cgggatggag ccaggcggga gccgacggag
901 ccgcttacac ccgcgcgccc gtgtgcgccc gcttctcctt cccggggacc accgggtccc
961 tggcgccgce cgccgcgct gccgcggccc ggaagctgc ggctacagc agtggcgccg
1021 gagcgccggg tggggcctg ggggcccgc agcagtacgg gcgcgcccgc ttcgccccgt
1081 cctactccag cccctaccg gcttacatgg ccgacgtggg cgcgtcctgg gccgcagccg
1141 ccgcgcctc cgccggcccc ttgcacagcc cggctctgca cagcctgcc gcccgggcca
1201 acccgccgc ccgacacccc aatctcgata tgtttgacga cttctcagaa ggcagagagt
1261 gtgtcaactg tggggctatg tccaccccgc tctggaggcg agatgggacg ggtcactatc
1321 tgtgcaacgc ctgcccctc taccacaaga tgaacggcat caaccggccg ctcatcaagc
1381 ctacagcccg gctgtccgce tcccgcgag tgggcctctc ctgtgccaac tgccagacca
1441 ccaccaccac gctgtggcgc cgcaatgccc agggcgagcc tgtgtgcaat gcctgcggcc
1501 tctacatgaa gctccacggg gtcccagcc ctcttgcaat gcggaaagag gggatccaaa
1561 ccagaaaacg gaagcccaag aacctgaata aatctaagac accagcagct ccttcaggca
1621 gtgagagcct tctcccgcg agcgggtgct ccagcaactc cagcaacgcc accaccagca
1681 gcagcgagga gatgcgtccc atcaagacgg agcctggcct gtcactcag tacgggcaca
1741 gcagctccgt gtcccagag ttctcagtc gtgcgatgtc tggcctcag cctccatcc
1801 accctgtcct ctggcctg aagctctccc cacaaggcta tgcgtctccc gtcagccagt
1861 ctccacagac cagctccaag caggactcct ggaacagcct ggtcttgccc gacagtacg
1921 gggacataat cactgcgtaa tcttccctc tccctcctca aattcctgca cggacctggg
1981 acttgaggga tagcaaagaa ggaggccctg ggctcccagg ggccggcctc ctctgcctgg
2041 taatgactcc agaacaaca ctgggaagaa acttgaagtc gacaatctgg ttaggggaag
2101 cgggtgttgg attttctcag atgcctttac acgctgatgg gactggaggg agcccaccct
2161 tcagcacgag cacactgcat ctctcctgtg agttggagac ttctttccca agatgtcctt
2221 gtcccctgcg tccccactg tggcctagac cgtgggtttt gcattgtgtt tctagcaccg
2281 aggatctgag aacaagcggg gggccgggccc ctgggacccc tgctccagcc cgaatgacgg
2341 catctgtttg ccatgtacct ggatgcgacg ggcccctggg gacaggccct tgccccatcc
2401 atccgcttga ggcatggcac cgcoctgcat ccctaatacc aatctgact ccaaaattgt
2461 ggggtgtgac atacaagtga ctgaacactt cctggggagc tacaggggca cttaaccac
2521 cacagcacag cctcatcaaa atgcagctgg caacttctcc cccagggtgcc tccccctgc
2581 tgccggcctt tgctccttca cttccaacat ctctcaaaaat aaaaatccct cttcccgctc
2641 tgagcgattc agctctgccc gcagcttgta catgtctctc ccctggcaaa acaagagctg
2701 ggtagttagt ccaaacggca cccctcgag ttcactgcag acccttcggt caccgtgtca
2761 cacatagagc gttctgagt aagaacaaaa cgttctgctg ctcaagccag tctggcaagc
2821 actcagccca gcctcgaggt ccttctgggg agagtgtaag tggacagagt cctggtcagg
2881 gggcaggagt gtcccaaggg ctggcccacc tgctgtctgt ctgctcctcc tagcccttgg
2941 tcagatggca gccagagtcc ctccaggact gcagcctcgc cccggcagaa gtcttttgtc
3001 caggaggcaa aaagccagag attctgcaac acgaattcga agcaaacaaa cacaacacaa
3061 cagaattcct ggaaagaaga cgactgctaa gacacggcag gggggcctgg agggagcctc
3121 cgactctgag ctgctccggg atctgcgccc ttctcctctg cacattgctg tttctgcccc
3181 tgatgctgga gctcaaggag actccttctc ctttctcagc agagctgtag ctgactgtgg
3241 cactactacg cctccccaca cgcccagacc cctcactcca aatcctact ggctgtagca
3301 gagaatacct ttgaaccaag attctgtttt aatcatcatt tacattgttt tcttccaaag
3361 gccccctcgt ataccctcc taaccacaa acctgttaac attgtcttaa ggtgaaatgg
3421 ctggaaaatc agtatttaac taataaattt atctgtattc ctctttcaaa aaa

2.1.6. Software

Sequenzierungen

Die Auswertungen der Sequenzen erfolgen mithilfe der Sequencer Demo 4.9 (Gene Codes Corporation).

Luciferase-Assays

Die Luminometermessungen des Berthold Mithras LB940 werden mithilfe der Mikrowin 2000 Software unterstützt. Die Messungen erfolgen in Reihen für den Berthold 96 Plattentyp (96 wells) nach den aufgeführten Messeinstellungen (Tabelle 17). Sie werden pro well wiederholt. Die weitere Auswertung der Rohdaten erfolgt mithilfe von Microsoft Excel und Graph Pad Prism 6 und ist unter „2.2.10“ beschrieben.

Tabelle 17: Messeinstellungen der Mikrowin 2000 Software

Messvorgang	Einstellungen
1. Schüttelvorgang	<ul style="list-style-type: none">• Dauer: 1 Sek• Geschwindigkeit: langsam• Diameter: 0,1 cm• Typ: linear
2. Lumineszenzmessung	<ul style="list-style-type: none">• Messzeit: 10 Sek• Kein Emissionsfilter

2.2. Methoden

In dieser Dissertation sollen verschiedene SF1-Mutationen in ihrer Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung sowie deren Interaktionen mit Kofaktoren charakterisiert werden. Hierzu werden im ersten Schritt in Ausgangskonstrukten der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in pcDNA-Vektoren durch Mutagenese spezifische Basenaustausche durchgeführt. Die Konstrukte werden anschließend durch Elektrophorese und Sequenzierung verifiziert und amplifiziert. Danach erfolgt deren Transfektion und Expression in HEK293- und Sertolizellen. Die funktionelle Analyse wird mit dem Dual Glo Luciferase System durchgeführt.

Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 7 dargestellt, im Folgenden sind deren Prinzipien und Durchführung beschrieben.

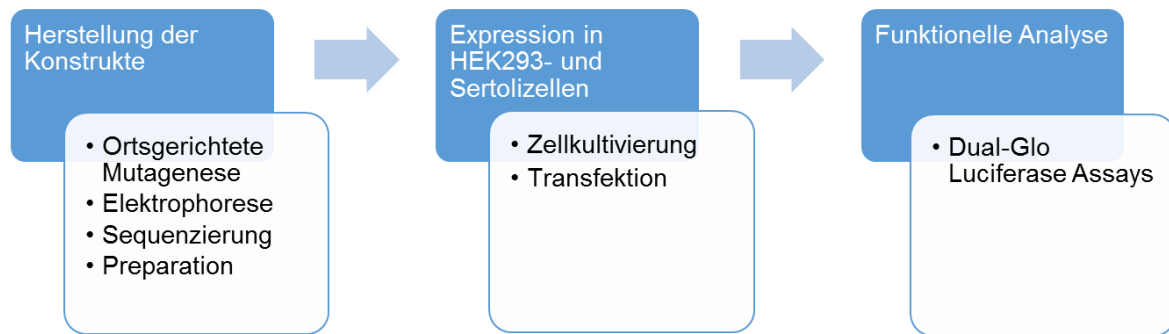


Abbildung 7: Übersicht über die Abfolge der Arbeitsschritte

2.2.1. Ortsgerichtete Mutagenese

Die Herstellung der SF1-Punktmutanten aus dem SF1-WT sowie die WT-Herstellung des Mutation tragenden GATA4-Plasmides erfolgt durch ortsgerechete Mutagenese (Tabelle 18). Alle Konstrukte befinden sich im pcDNA3-Vektor.

Tabelle 18: Übersicht über die Ausgangsplasmide und hergestellten Plasmide

Ausgangsplasmid	Hergestellte Plasmide
hSF1-WT	hSF1-p.G35E
	hSF1-p.R62C
	hSF1-p.P131L
	hSF1-p.A154T
	hSF1-p.R191C
	hSF1-p.L376F
hGATA4-A280T	hGATA4-WT

Prinzip:

Grundlage der ortsgerecheten Mutagenese ist die molekularbiologische Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Sie wird zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzbereichen eingesetzt und verläuft in Zyklen aus drei aufeinanderfolgenden Schritten in Thermocyclern (Schorderet, 1994).

Als erstes erfolgt die Denaturierung (DNA-Doppelstrang-Trennung). Im zweiten Schritt, dem Annealing, hybridisieren Oligonukleotid-Primer an die Einzelstränge und legen die Startsequenz für die DNA-Synthesereaktion in der PCR fest. Der dritte Schritt ist die Elongation (Polymerisation und Strangsynthese): Die Strangsynthese erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, welche komplementär angelagerte 2'-

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) ligiert. Jeweils gewonnene Amplifikate dienen wiederum als Ausgangsmaterial für den nächsten Zyklus.

Die ortsgerichtete Mutagenese ermöglicht nun eine gezielte Substitution von Nukleotiden. Ihr Prinzip der aufeinanderfolgenden Schritte von Präparation der Ausgangsplasmide, Mutagenese-PCR, *DpnI*-Verdau und Transformation ist nachfolgend beschrieben und wird in Abbildung 8 dargestellt.

1. Präparation der Ausgangsplasmide: Die Ausgangs-DNA wird durch Transformation in DH5 α -Bakterien und Präparation gewonnen.
2. Mutagenese PCR zur Synthese von mutierten DNA-Strängen: Es erfolgt eine PCR mit Mutagenese-Primern. Die bestehen aus einem forward- und einem reverse-Primer, welche beide die gewünschte Punktmutation enthalten und zu dem Rest der Gensequenz komplementär sind. Der Basenaustausch sollte dabei mittig in den Primersequenzen liegen, die 5'- und die 3'-Enden der Primer hybridisieren mit der Ausgangs-DNA. Ausgehend von diesen Primern wird das Plasmid durch eine *DNA-Polymerase* vollständig amplifiziert.
3. *DpnI*-Verdau des Amplifikationsproduktes: Da die entstehenden mutierten Plasmide im Gegensatz zur Ausgangs-DNA noch nie in *E.coli* vermehrt wurden, besitzen sie keine A-Methylierung von GATC. Diese dienen als *DpnI* Schnittstellen. Somit ermöglicht der *DpnI*-Verdau des Amplifikationsproduktes eine Selektion der mutierten Plasmide.
4. Als letztes erfolgt die Transformation zur Gewinnung der spezifischen Klone.

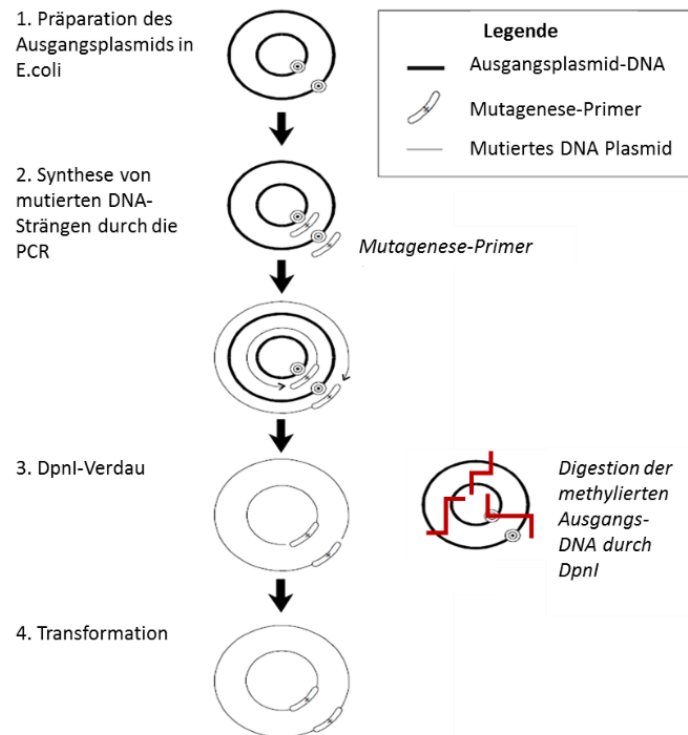


Abbildung 8: Prinzip der ortsgerichteten Mutagenese. Durch Mutagenese-PCR entstehen die spezifischen Mutanten aus dem Ausgangsplasmid. Nach dem DpnI-Verdau, bei welchem eine Digestion der methylierten Ausgangs-DNA erfolgt, wird das PCR-Produkt transformiert. Nach (QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, 2015).

Durchführung:

Mutagenese-PCR

Die Synthese von mutierten DNA-Strängen durch PCR erfolgt nach folgendem Pipettierschema für den PCR-Ansatz (Tabelle 19).

Tabelle 19: Pipettierschema für Mutagenese-PCR

Substanz (Konzentration)	Finale Konzentration
10x Pfu-Turbo Buffer	1x
DNA Ausgangs-dsDNA (100 ng/μl)	200ng
Oligonukleotide Primer forward (100 ng/μl)	100ng
Oligonukleotide Primer revers (100 ng/μl)	100ng
dNTP-Mix (10 mM, Invitrogen)	1,0 mM
Pfu DNA-Polymerase (2,5U/μl)	0,05U
HPLC-Wasser	ad Endvolumen
Gesamt	50 μl

Die für die Versuche verwendete *Pfu-Polymerase* aus *Pyrococcus furiosus* hat eine 3'-5'-exonukleaseabhängige Korrekturlesefunktion und dadurch niedrigere Kopierfehler als andere *DNA-Polymerasen* wie die *Taq-Polymerase* (Cline et al., 1996).

Um die optimale Temperatur für die Mutagenese zu ermitteln, werden teilweise mit dem ersten PCR-Ansatz Temperaturgradienten durchgeführt. Dazu werden jeweils 5 µl des PCR-Ansatzes unterschiedlichen Annealing-Temperaturen von 55-70°C exponiert (siehe Tabelle 20). Die Amplifikations-Effizienz wird mittels Elektrophorese nach Zugabe von 4 µl Loading Dye in einem 1% Agarose-Gel überprüft. Eine Mutagenese-PCR wird mit der Annealing-Temperatur der besten Bande wiederholt (Tabelle 21).

Die Mutagenese wird mit 20 bis 200 ng Ausgangs-dsDNA-Menge durchgeführt. Bei Bedarf (frustrane Mutagenese) wird dem PCR-Ansatz 2,5 µl DMSO zugesetzt.

Tabelle 20: PCR-Programm für Mutagenese PCR mit Temperaturgradient

Segment	Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur
1	1	30 Sek	95°C
2	22	30 Sek	95°C (Denaturierung)
		30 Sek	55-70°C (Annealing)
		8 Min	68°C (Elongation)
3	1	dauerhaft	4°C

Tabelle 21: PCR-Programm für Mutagenese-PCR

Segment	Zyklusanzahl	Dauer	Temperatur
1	1	30 Sek	95°C
2	18	30 Sek	95°C (Denaturierung)
		30 Sek	55°C (Annealing)
		8 Min	68°C (Elongation)
3	1	10 Minuten	72°C
4	1	dauerhaft	4°C

DpnI-Verdau des Amplifikationsproduktes

Für den *DpnI*-Verdau des Amplifikationsproduktes wird zu dem vollständigen PCR-Ansatz 40 Units *DpnI* gegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation von 4 Stunden bei 37°C.

Transformation und Isolation des mutierten Plasmids

Die Transformation des vollständigen Ansatzes erfolgt nach dem nachfolgenden Protokoll in XL1-blaue superkompetente Zellen oder in E.coli DH5 α . Die Bakterien werden auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Als Kontrollen werden ebenfalls eine Kontrolle mit Amplifikationsprodukt ohne *DpnI*-Verdau sowie eine Kontrolle aus experimenteller DNA mitgeführt.

Die gewachsenen Klone werden am nächsten Tag gepickt, Mini-Kulturen und Agarplatten beimpft. Nach der Präparation der Mini-Kulturen erfolgen Sequenzierungen der Plasmid-DNA, um die gewünschte Mutation nachzuweisen. Dabei wird in einer ersten Sequenzierung lediglich der Sequenzabschnitt der gewünschten Mutation überprüft, um diese zu bestätigen. Bei positivem Mutationsnachweis wird die gesamte Gensequenz überprüft, um weitere unerwünschte Mutationen auszuschließen.

Nach der Prüfung der mutierten Plasmid-DNA werden Midi-Kulturen und Glycerolstocks der spezifischen Klone angefertigt.

2.2.2. Transformation von chemisch kompetenten E.coli

Prinzip

Die Transformation bezeichnet die Veränderung der genetischen Information einer Zelle durch Einschleusen eines Vektors mit dem Ziel seiner Vermehrung. Für die Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente E. coli Bakterien (DH5 α) wurde in dieser Arbeit die Permeabilität der Zellwände thermisch durch einen kurzen Hitzeschock bei 42°C erhöht (Panja et al., 2006). Nach der erfolgreichen Aufnahme der Plasmid-DNA wird diese von den Wirtszellen repliziert und exprimiert. Da die Plasmidvektoren häufig mindestens ein Gen tragen, welches für eine Antibiotikaresistenz kodiert (z.B. Ampicillin), ermöglicht die Anzucht der Bakterien in spezifischen antibiotikahaltigen Medien eine Selektion der transformierten Bakterien.

Durchführung

1 μ l DNA (Konzentration $c=100$ ng/ μ l) werden zu 50 μ l chemisch kompetenten E.coli gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. In dieser Zeit kann sich die DNA an die Zellwand anlagern. Der Hitzeschock, bei dem die Übertragung der DNA in das Bakterium erfolgt, wird für 30 Sekunden bei 42°C in einem Thermomixer durchgeführt. Um eine Schädigung der Bakterien zu verhindern, werden diese danach für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Danach werden die Bakterien in 950 μ l vorgewärmtes SOC-Medium überführt

und bei 37°C für 60 Minuten bei ca. 225 rpm in einem Großraum-Schüttelinkubator inkubiert. Das nährstoffhaltige SOC-Medium ermöglicht ein unselektives Wachstum von transformierten und nicht-transformierten Bakterien, da die transformierten Bakterien so die Möglichkeit haben ihre Resistenzgene zu exprimieren. Um die Bakterien dann zu selektieren, werden 200 µl des Transformationsansatzes auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) mithilfe einer sterilen Pasteur-Pipette ausgestrichen, invertiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag werden einzelne Kolonien gepickt und in ampicillinhaltigen LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) ca. 16 h bei 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert, um dann eine Präparation durchzuführen oder eine Lagerung der Kulturen in Glycerol zu ermöglichen.

Für XL1-Blue Zellen wird das Protokoll für die Mutagenese entsprechend durchgeführt, wobei NZY-Medium und –Agar verwendet werden.

2.2.3. DNA-Aufarbeitung und -Lagerung

Im nachfolgenden sind die Präparationen von Plasmid-DNA sowie Konzentrationsmessungen, Verdünnungen und Lagerung beschrieben.

Mini- und Midipräparationen

Prinzip:

Präparationen dienen der Isolation von Plasmid-DNA aus Prokaryoten. In den verwendeten Kits beruht dies auf der Adsorption von DNA an Silica-Membran-Säulen in Gegenwart hoher Konzentrationen chaotroper Salze (Boom et al., 1990). Zuvor werden die E.coli-Kulturen lysiert und der Zelldetritus abzentrifugiert. Nach wiederholten Waschschritten wird die adsorbierte DNA diluiert.

Durchführung:

Um Plasmid-DNA der hier verwendeten „high copy“ Plasmide zu extrahieren, werden transformierte Bakterien präpariert. Dabei werden für Minipräparationen 4 ml und für Midipräparationen 200 ml transformierte E.coli Übernachtskulturen verwendet. Die Präparationen werden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die gewonnene Plasmid-DNA in HPLC-Wasser resuspendiert.

Um die Präparation zu optimieren, wird bei den Minipräparationen die Kultur bei 5300g und Raumtemperatur 15 Minuten abzentrifugiert und in 600 µl HPLC-Wasser resuspendiert.

Eine eventuell notwendige Aufreinigung erfolgt mithilfe des NucleoSpin® Gels and PCR Clean-up entsprechend des Protokolls.

Konzentrationsmessung und Verdünnung der Plasmid-DNA

Die photometrische Konzentrationsmessung der Plasmid-DNA nach Präparation erfolgt durch das Spektrophotometer „Biophotometer“, welches in Abhängigkeit von der Lichtabsorption nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Konzentration der absorbierenden Substanz berechnet.

Für die Transfektion eukaryotischer Zellen bei den dualen Luciferase Assays wird die Plasmid-DNA diluiert, wobei die Konzentrationen so hoch wie möglich und so niedrig wie nötig ausgewählt werden. Für die Hauptversuche werden DNA-Konzentrationen von 35 ng/µl angestrebt, für die Dosis-Wirkungskurven zusätzlich 10 ng/µl sowie 70 ng/µl. Die photometrische Konzentrationsmessung von Verdünnungen für die Transfektion eukaryotischer Zellen erfolgt mit Hilfe des für geringe DNA-Konzentrationen sensitiven Nanodrops (Desjardins & Conklin, 2010). Die Verdünnungen werden bei 4°C gelagert.

Lagerung

Die Plasmid-DNA der Präparationen wird bei -20°C gelagert.

Um eine langfristige Lagerung von plasmidhaltigen Bakterienkulturen zu ermöglichen, werden Glycerolstocks angelegt. Dafür wird 1 ml Bakterienkultur 1:1 mit Glycerol vermischt und bei -70°C gelagert.

2.2.4. Agaroseelektrophorese

Die Agaroseelektrophorese dient der Überprüfung der Bandenstärke des Temperaturgradienten-Ansatzes in der Mutagenese-PCR sowie für den nachfolgend beschriebenen Restriktionsmorphismus.

Prinzip:

Eine geeignete Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe sowie deren Quantifizierung ist die Elektrophorese. Die DNA-Fragmente durchwandern als elektrisch geladene Moleküle ein grobporiges Agarosegel in einer ionischen Pufferlösung unter Einfluss eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode. Die Moleküle bewegen sich mit einer Geschwindigkeit proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts durch die Gelmatrix (Johnson et al., 1980). Sie separieren sich dabei

entsprechend ihrer Größe und bilden charakteristische Banden, welche durch eine mitgeführte Referenz mit bekanntem Molekulargewicht zugeordnet werden (A. M. Jones et al., 2007). Ethidiumbromid in Gel und Puffer ermöglicht die Visualisierung der Banden bei UV-Exposition (Borst, 2005).

Durchführung:

Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels werden 60 ml 5XTBE mit 0,6 g Agarose erhitzt, bis die Agarose vollständig gelöst ist. Nach Abkühlung werden 1,5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel zur Polymerisation in eine Gelkammer mit Kamm gegossen.

Das Gel wird nachfolgend in eine mit 5XTBE gefüllte Elektrophorese-Apparatur überführt. Die zu analysierenden DNA-Proben werden mit Loading-Dye versetzt und mit einer 1kb DNA Ladder jeweils in eine Geltasche überführt. Die Elektrophorese erfolgt bei einer angelegten Spannung von 100 V für 20-40 Minuten, die Darstellung und Auswertung unter UV-Licht mithilfe des GeneFlash.

2.2.5. Restriktionslängenmorphismus

Der Restriktionslängenmorphismus mit nachfolgender Agarelektrophorese wird zur Überprüfung der Plasmide des SF1-Wildtyps und der SF1-Mutanten verwendet.

Durch Vergleich der Bandenstärke kann dabei ausgeschlossen werden, dass in einem Vektor SF1 doppelt inkloniert wurde.

Prinzip:

Restriktionsenzyme schneiden DNA-Stränge durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung spezifischer DNA-Sequenzen. Mit Hilfe nachfolgender Agarelektrophorese können sowohl Bandenstärke als auch Bandenmuster der visualisierten DNA-Fragmente bewertet werden. Durch Vergleich der Bandenstärke kann dabei ausgeschlossen werden, dass in einem Vektor Targetgene doppelt inkloniert wurden.

Durchführung:

Mithilfe der NEBcutter-Software werden Restriktionsenzyme ausgewählt, welche vor und hinter dem SF1-Insert auf dem pcDNA-Vektor schneiden (Vincze et al., 2003). Auf Eis werden die Restriktionsenzyme mit entsprechendem Buffer, Plasmid-DNA und HPLC

nach folgendem Protokoll (Tabelle 22) zusammengegeben, anschließend zentrifugiert und bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Tabelle 22: Pipettierschema des Restriktionsansatzes

Substanz (Konzentration)	Finale Konzentration
Plasmid-DNA (70 ng/µl)	350 ng
<i>Bam</i> HI (20 000 U/ml)	10U
<i>Hinc</i> II (10 000 U/ml)	5U
Cutsmart Buffer	1X
HPLC-Wasser	ad Endvolumen
<i>Gesamt</i>	10 µl

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt mithilfe der Agaroseelektrophorese.

2.2.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Verifikation der hergestellten Konstrukte.

Prinzip:

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der exakten Basenabfolge in einem DNA-Molekül. Die Sequenzierungen werden nach Sanger mit der Didesoxymethode durchgeführt (Sanger et al., 1977). Hierbei wird in einem ersten Schritt eine Labelling-PCR durchgeführt. Neben einer Ausgangs-DNA, Oligonukleotid-Primern, dNTPs und der *DNA-Polymerase* werden dem Sequenzier-PCR-Ansatz mit 4 unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Diese ddNTPs sind den dNTPs sehr ähnlich und werden bei der Strangsynthese an dem 5'-Kohlenstoffatom an das vorherige Nukleotid über eine Phosphodiesterbindung angehängt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe kommt es jedoch dann zu einem Abbruch der Kettenverlängerung. So entstehen ausgehend von der Startsequenz des verwendeten Oligonukleotid-Primers fluoreszenzmarkierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, welche im Genetic Analyzer elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden (Shendure et al., 2011).

Durchführung

Der Sequenzieransatz wird nach folgendem Schema (Tabelle 23) pipettiert:

Tabelle 23: Pipettierschema für den Sequenzieransatz.

Substanz (Konzentration)	Finale Konzentration
Buffer (BigDye Terminator V3.1, 5x Sequencing Buffer)	1x
Primer (c=100 ng/µl)	100ng
BigDye Mix (BigDye Terminator V3.1)	1x
DNA (c=100 ng/µl)	200ng
MQ-Wasser	ad Endvolumen
<i>Gesamt</i>	10 µl

Der verwendete BigDye Mix enthält ddNTPs, dNTPs und DNA-Polymerase. Die DNA-spezifischen Primer werden entsprechend des zu lesenden DNA-Abschnitts ausgewählt. Die Labelling-PCR für die DNA-Synthese mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden erfolgt nach dem aufgeführten Protokoll in einem Thermocycler (Tabelle 24).

Tabelle 24: PCR-Programm für Sequenzierung (Thermocycler Mastercycler ep gradient S)

Segment	Zyklenanzahl	Dauer	Temperatur
1	1	5 Min	95°C
2	30	30 Sek	95°C (Denaturierung)
		15 Sek	55°C (Annealing)
		4 Min	60°C (Elongation)
3	1	7 Minuten	60°C
4	1	dauerhaft	4°C

Danach erfolgt eine Natriumacetat-Ethanol-fällung der Sequenzreaktion. Dabei werden zunächst 2 µl 1,5M Natriumacetat (pH 5,5) und 20 µl 96% Ethanol zu dem Sequenzieransatz gegeben, um die DNA aus der wässrigen Lösung zu fällen. Die Sedimentation der ausgefällten DNA erfolgt mit Hilfe eines Streifenrotors (10500 U/min, 30 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wird verworfen und es erfolgt ein Waschschrift mit 200 µl 70% Ethanol und erneuter Zentrifugation (10500 U/min, min. 20 Minuten, 15°C). Das DNA-Pellet wird dann 5-10 Minuten bei 37°C getrocknet.

Bis zum Beladen des Genetic Analyzers werden die Proben bei -20°C gelagert. Die Sequenzierung erfolgt hierbei durch ein fluoreszenz-basiertes Elektrophorese System mit 16 Kapillaren (Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers, 2010).

2.2.7. Zellkultivierung

Die Zellkulturexperimente erfolgen in HEK293- und TM4-Zellen. Die Bedingungen ihrer Kultivierung sowie Mykoplasmentestung und Aussaat in 96-well-Platten für die dualen Luciferase-Assays sind hier dargestellt.

Zelllinien und Kultivierung

Prinzip:

Für die Versuche werden HEK293- und TM4-Zellen ausgewählt. HEK293-Zellen eignen sich als humane Zelllinie gut zur funktionellen Evaluation der Geschlechtsentwicklung, da sich renale, adrenale und gonadale Vorläuferzellen der Gewebe aus den gleichen Regionen des primitiven Mesoderm und Zölomepithel entwickeln (Morohashi, 1997). TM4-Zellen als primäre murine Testiszelllinie stellen vor allem für die Untersuchung der Sertolizellfunktion eine wichtige Ergänzung dar.

Durchführung:

Die Durchführung zellbiologischer Arbeiten erfolgt unter einer Sterilwerkbank. Stets werden die verwendeten Medien in einem 37°C warmen Wasserbad vorgewärmt.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgt in T25 (75 cm²) oder T75 (175 cm²) Zellkulturflaschen, die Inkubation in entsprechenden Brutschränken bei 37°C und 95% Luftfeuchtigkeit.

Die Passagen oder Aussaaten werden bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens durchgeführt. Es wird dabei auf gleiche Zeitabstände des Mediumwechsels und gleiche Mengen der passagierten Zellen geachtet, um möglichst homogene Versuchsbedingungen zu garantieren. Auch werden die Passagen bis max. 30 für die HEK-Zellen und max. 20 für die TM4-Zellen durchgeführt. Bei den Passagen der Zellen wird das Vollmedium mit einer sterilen Vakuumpumpe entfernt. Danach wird vorsichtig PBS auf den Zellrasen pipettiert und sofort im Anschluss mit einer sterilen Vakuumpumpe entfernt („waschen“ der Zellen), wobei darauf geachtet wird die Zellen nicht zu berühren, um sie nicht vorzeitig abzulösen. Da die verwendeten Zellen adhärent wachsen, erfolgt die Ablösung der Zellen von den Zellkulturflaschen mit 700-1000 µl Trypsin/EDTA und einer kurzen Inkubation von max. 3 Minuten bei 37°C. Eine vorsichtige Resuspension der Zellen zur Zellseparation erfolgt in dem vorgewärmten Vollmedium. Für die Erhaltungskultur wird die Zellsuspension in frischem Vollmedium 1:10 verdünnt.

Zur langfristigen Lagerung der Zelllinien bei -80°C wird die Zellsuspension der Zellpassage in sterile Falcon-Röhrchen überführt, 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 200 g abzentrifugiert und das Zellpellet in dem Einfriermedium (mit 10 % DMSO, um eine Kristallbildung während des Einfrierprozesses zu verhindern) resuspendiert. Eine rasche Abkühlung der Cryo-Röhrchen mit Aliquots von je 1 ml des resuspendierten Zellpellets gelingt mit einem Cryo-Einfriergerät bei -80°C über Nacht, danach erfolgt die langfristige Lagerung in Flüssigstickstoff.

Bei erneuter Inkulturnahme der eingefrorenen Zellen werden diese in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und rasch in vorgewärmtes Vollmedium pipettiert. Ein Mediumwechsel zum Entfernen der abgestorbenen Zellen und des zelltoxischen DMSO erfolgt am nächsten Tag, ein weiterer Mediumwechsel zwei Tage später.

Mykoplasmentestung

Der Ausschluss eines Mykoplasmenbefalls der Zelllinien erfolgte nach dem Standardprotokoll des PCR Mycoplasma Test Kit I/C.

2.2.8. Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgt nach deren Aussaat mit dem Fugene-Transfektionsreagenz und den angefertigten Plasmid-DNA-Dilutionen.

Prinzip:

Die Transfektion erfolgt nach einem in der „Unité du Génétique du développement humain“ am Institut Pasteur etablierten Protokoll mit Fugene 6. Dabei handelt es sich um eine liposomale Transfektionsmethode, welche eine geringe Zelltoxizität bei guter Transfektionseffizienz vieler Zelllinien aufweist (Technical Manual: Fugene® 6 Transfection Reagent, 2011, Schagat & Kopish, 2010). Ein weiterer Vorteil ist, dass das Protokoll nach der Transfektion keine weiteren Waschschrte oder Mediumwechsel vorsieht, wodurch Zellzahl und Wachstumsbedingungen so konstant wie möglich gehalten werden.

Durchführung:

Die Aussaat der Zellen erfolgt in 96-well-Platten, welche 24h später einzeln transfiziert werden.

Vor der Aussaat erfolgt die Zellzahlbestimmung mikroskopisch in Neugebauer Zählkammern. Dazu werden je 4 große Quadrate mit jeweils 16 kleinen Quadraten ausgezählt und der Mittelwert gebildet.

Die Zellkonzentration ergibt sich dementsprechend:

$$\text{Ausgezählter Mittelwert der Neugebauer Zählkammern} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ = \text{Zellkonzentration (Zellzahl} \times 10^4 \text{ml)}$$

Die Aussaat der HEK293 oder TM4-Zellen erfolgt in einer Dichte von 10 000 Zellen/well mit 200 µl Medium pro well in einer 96-well Platte. Für die HEK293-Zellen werden die 96-well Platten vorher mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu werden die wells mit 50 µl 1:1 Poly-L-Lysin/1xPBS bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 100 µl PBS gewaschen.

Die Transfektion erfolgt für jedes well separat. Der Berechnung des Volumens der jeweiligen Plasmidverdünnungen für die Transfektion liegt das folgende Grundschemata pro well zugrunde (Tabelle 25).

Tabelle 25: Grundschemata der Transfektion zur Berechnung der Volumina der zu transfizierenden Konstrukte. Um immer die gleiche DNA-Menge zu verwenden werden grundsätzlich 36 ng transfiziert. Insgesamt können bis zu drei Transkriptionsfaktoren untersucht werden (X, Y, Z). Für die Untersuchung eines Transkriptionsfaktors (X) werden 7 ng verwendet mit 14 ng Leervektor addiert. Werden weitere Transkriptionsfaktoren (Y, Z) untersucht, werden ebenfalls 7 ng des jeweiligen Transkriptionsfaktors verwendet und die Menge des Leervektors dementsprechend um 7 ng reduziert.

Untersuchung der Transkriptionsfaktoren	pRL (ng)	Promoter (ng)	Transkriptionsfaktor (ng)			Leer-Vektor (ng)	Gesamt (ng)
			X	Y	Z		
X	5	10	7	-	-	14	36
X + Y	5	10	7	7	-	7	36
X + Y + Z	5	10	7	7	7	0	36

Für die Negativkontrolle werden 21 ng Leervektor und kein Transkriptionsfaktor transfiziert. Die Plasmidkompositionen der Versuchsansätze werden in PCR-Streifen kurz vor der Transfektion pipettiert und kurz zentrifugiert.

Pro well werden 5 µl vorgewärmtes Optimem und 0,3 µl Fugene® Transfektions Reagenz gemischt und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird das Optimem/Fugene-Gemisch zu der Plasmid-DNA pipettiert und 20 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert, um dann jedes well entsprechend der addierten Volumina von Transfektionsreagentien und Plasmid-DNA zu transfizieren.

Die Zellen werden weitere 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.9. Duale Luciferase Assays

Zur funktionellen Analyse werden duale Luciferase Assays durchgeführt.

Prinzip:

Duale Luciferase Assays haben eine hohe experimentelle Präzision und erlauben über Biolumineszenzmessung von Reportern Rückschlüsse auf die eukaryotische Gen-Expression *in vivo* (Protocols & Application Guide: Bioluminescent Reporter Gene Assays, 2015). Dual meint dabei eine simultane Expression und Messung von 2 individuellen Reportern (*Firefly Luciferase* und *Renilla Luciferase*) in einem System.

Neben den zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren (mit konstitutiv exprimiertem pCMV-Promoter in experimentellen Vektoren) werden der experimentelle Reportervektor (experimenteller Promoter gekoppelt an das Firefly Luciferase Gen) sowie ein Standardvektor (konstitutiv exprimierter pCMV-Promoter gekoppelt an das Renilla Luciferase Gen) in die Zellen kotransfiziert. Die Zellen exprimieren die Transkriptionsfaktoren, welche an ihre spezifischen Promoter-Bindungsstellen des experimentellen Reportervektors binden und somit die Transkription der *Firefly Luciferase* bedingen. Die *Renilla Luciferase* wird unabhängig von den Transkriptionsfaktoren transkribiert. Durch Translation entstehen Luciferase-Enzyme, welche bei Zugabe entsprechender Substrate spezifische Biolumineszenz-Reaktionen katalysieren (Abbildung 9) (Technical Manual: Dual-Glo® Luciferase Assay System, 2015).

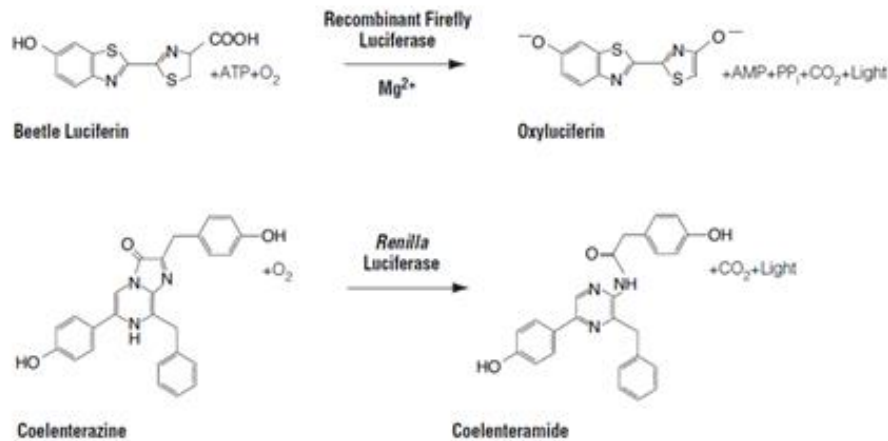


Abbildung 9: Durch Firefly und Renilla Luciferase katalysierte Biolumineszenz-Reaktionen. Die Mono-Oxygenierung von Beetle Luciferin wird durch die Firefly Luciferase in Anwesenheit von Magnesium, ATP und molekularem Sauerstoff katalysiert. Bei der Oxidationsreaktion von Beetle Luciferin durch die Firefly Luciferase wird Licht der Wellenlänge 560 nm emittiert. Im Gegensatz dazu wird die Mono-Oxygenierung von Coelenterazon durch die Renilla Luciferase katalysiert und benötigt lediglich molekularen Sauerstoff. Bei der Oxidation von Coelenterazon durch Renilla Luciferase wird Licht der Wellenlänge 480 emittiert. Aus (Technical Manual: Dual-Glo® Luciferase Assay System, 2015)

Die Bildung lumineszierender Produkte unterschiedlicher Emissionsspektren kann mithilfe eines Luminometers quantifiziert werden und erlaubt somit Rückschlüsse auf die Expression der Reporterenzyme.

Die Kontrolle durch die Expression des Standardvektors erlaubt eine maximale Lumineszenzmessung aufgrund zellphysiologischer Bedingungen und bietet als mathematische Referenz den Ausgleich von Schwankungen wie z.B. aufgrund von Unterschieden in Zellviabilität, Transfektionseffizienz, Zellyse-Effizienz und Probenaufarbeitung (Technical Manual: Dual-Glo® Luciferase Assay System, 2015).

Der experimentelle Reportervektor ermöglicht Rückschlüsse auf die spezifischen experimentellen Bedingungen durch Transkriptionsfaktoren, welche die Expression des Promoters beeinflussen. Als zusätzliche negative Kontrolle dient ein Leervektor, welcher die minimale Lumineszenz im Sinne einer unspezifischen Promoteraktivierung repräsentiert.

Das Prinzip der dualen Luciferase Assays ist in Abbildung 10 veranschaulicht.

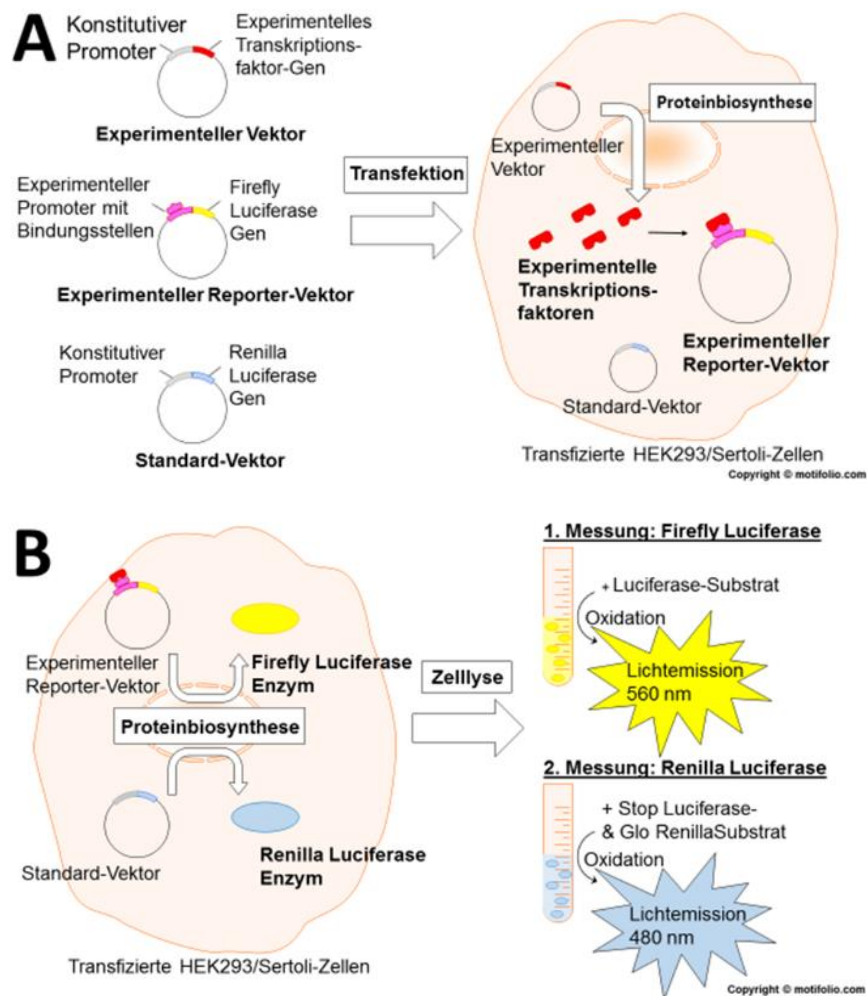


Abbildung 10: Prinzip der dualen Luciferase Assays. (A) Kointransfektion der Vektoren. Der Standardvektor wird konstitutiv exprimiert. Die konstitutiv exprimierten experimentellen Transkriptionsfaktoren (SF1, SOX9, GATA4) binden an ihre spezifischen Bindungsstellen des experimentellen Promoters auf dem Reporter Vektor (AMH, SOX9-Enhancer TESCO oder CYP11A1). (B) Durch Translation und Transkription entstehen Luciferase-Enzyme, welche durch Substrate zur Lichtemission angeregt werden und durch ein Luminometer quantifiziert werden. Nach (Technical Manual: Dual-Glo® Luciferase Assay System, 2015). Verwendete Abbildungs-Bausteine von motifolio.

Durchführung:

Die Methode der dualen Luciferase Assays wurde während eines Forschungsaufenthaltes unter der Supervision von Prof. Kenneth McElreavey und PhD Anu Bashamboo in der „Unité du Génétique du développement humain“ am Institut Pasteur in Paris erlernt (Anu Bashamboo et al., 2010, 2014; Lourenço et al., 2011) und im Anschluss am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie in Berlin durchgeführt.

Grundsätzlich werden mindestens 3 Replikate des gleichen Versuchsansatzes durchgeführt. Insgesamt werden mindestens 1 Experiment für die Vorversuche und mindestens 3 unabhängige Experimente für die Hauptversuche wiederholt.

Nach der Aussaat und Transfektion der Zellen wird die Luciferase-Messung mit dem Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) an dem Luminometer von Berthold durchgeführt (vgl. Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht über die zeitlichen Abläufe von Aussaat, Transfektion und Durchführung der dualen Luciferase Assays

Tag 0	Aussaat der Zellen in 96-well Platten
Tag 1	Transfektion der Zellen mit Fugene 6
Tag 3	Dualer Luciferase Assay mit Luminometer-Messung

Die transfizierten 96-well Platten werden an Tag 3 nach der Aussaat gemessen. Dafür werden die 96-well Platten invertiert, um das Medium und Transfektionsreagenzien zu entfernen, und 25 µl/well Optimem hinzugegeben. Die Äquilibration erfolgt 15 Minuten auf dem Schüttelinkubator. Dann werden 20 µl/well Dual-Glo® Luciferase Reagent, welches die Zelllyse induziert und das Luciferase Substrat enthält, hinzugegeben und abermals 15 Minuten lichtgeschützt äquilibriert. Vor der Messung wird der Versuchsansatz in eine 96-well-Luminometerplatte überführt. Die Messung der Luciferase erfolgt im Luminometer. Nach Abschluss der Messung werden 20 µl/well Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent hinzugegeben und nach einer erneuten Äquilibration von 15 Minuten abermals gemessen.

Während des Versuchs werden als Kontrolle 4 wells mitgeführt, welche lediglich untransfizierte Zellen und entsprechend dem Protokoll Dual-Glo Luciferase Reagenzien enthalten. Sie dienen der Ermittlung einer unspezifischen Hintergrund-Lumineszenz aufgrund der Reagenzien oder des Luminometers.

2.2.10. Umrechnung der Rohdaten, statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Umrechnung der Rohdaten

Background-Subtraktion: Um die Effekte einer unspezifischen Hintergrund-Lumineszenzmessung zu minimieren, werden die Mittelwerte der Luciferase- und Renilla

Hintergrund-Lumineszenz von den Rohwerten der experimentellen Luciferase- und Renilla-Rohdaten subtrahiert.

Berechnungen der Luciferase/Renilla Ratios: Um die Werte zu standardisieren, wird die L/R-Ratio für die jeweiligen Rohdaten berechnet.

$$\frac{L}{R} - \text{Ratio} = \frac{RLU \text{ Luciferase}}{RLU \text{ Renilla}}$$

Berechnungen der Fold change: Um die Fold change als Aktivität über dem Leervektor zu ermitteln, wird die L/R-Ratio durch den Mittelwert des Leervektors geteilt.

$$\text{Mittelwert der } \frac{L}{R} - \text{Ratio des Leervektors} = \frac{\text{Summe der } \frac{L}{R} - \text{Ratios des Leervektors}}{\text{Anzahl der wells}}$$
$$\text{Fold change} = \frac{\frac{L}{R} - \text{Ratio}}{\text{Mittelwert der } \frac{L}{R} - \text{Ratio des Leervektors}}$$

Berechnungen der prozentualen Wildtypaktivität: Um die verschiedenen Experimente an unterschiedlichen Tagen und damit unterschiedlichen experimentellen Bedingungen vergleichen zu können, wird die prozentuale Wildtypaktivität berechnet.

$$\% \text{ Wildtypaktivität} = \frac{\text{Fold change}}{\text{Mittelwert der Fold change des Wildtyps}}$$

Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung werden mindestens 3 unabhängige Experimente in mindestens 3er Replikaten für einen Versuchsansatz ausgewertet. Signifikante Outliers werden identifiziert und exkluiert (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs2>).

Prüfung der Normalverteilung: Zur Überprüfung der Gauss'schen Verteilung wird der D'Agostino&Pearson omnibus normality Test durchgeführt. In der Literatur werden verschiedenste Tests zu Überprüfung der Normalverteilung empfohlen wie der Anderson–Darling, Shapiro–Wilk, and Shapiro–Francia und D'Agostino Test, deren Ergebnisse sich unterscheiden (Henderson, 2006; Zhang & Wu, 2005). Gerade für experimentelle Versuche wird dabei oft keine Normalverteilung der kontinuierlichen Parameter gefunden, sodass empfohlen wird, die jeweiligen Einflussfaktoren der experimentellen Bedingungen sowie eine genaue Exploration der Ergebnisse durchzuführen, um sich für parametrische oder non-parametrische Testmethoden zu

entscheiden (Schoder et al., 2006). Non-parametrische Testmethoden können bei Unsicherheiten über die Verteilung der Messwerte eingesetzt werden, sie können jedoch zu einem gewissen Verlust der Power führen (Schoder et al., 2006).

Da die Ergebnisse zum Teil nicht normalverteilt sind, erfolgen nonparametrische statistische Methoden.

Ermittlung des Signifikanzniveaus: Um Unterschiede der Stichproben verschiedener Gruppen zu untersuchen, wird der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der Kruskal-Wallis-Test ist ein nichtparametrischer Test für unabhängige Stichproben.

Um generelle signifikante Gruppenunterschiede zu ermitteln, werden dabei die Mediane der Gruppen untersucht. Für die multiplen Vergleiche berechnet die Teststatistik Unterschiede von Rangreihen der Mediane. Zur Korrektur für multiple Vergleiche, welche den Alpha-Fehler vergrößern können, wird der Dunn's multiple comparison test durchgeführt. Dabei wird für die einfachen Assays die Aktivierung des SF1-Wildtyp als Referenz gesetzt. Bei den Synergie-Assays wird die Aktivierung eines Promoters (z.B. SOX9-Enhancer TESCO) durch SF1-WT mit Kofaktor (z.B. SOX9) als Referenz verwendet. Entsprechendes gilt für die einfachen dominant-negativen Assays und die dominant-negativen Synergie Assays. Für die Interaktionsanalysen wird die zusätzliche Aktivierung durch SF1-WT mit dem Interaktionspartner im Vergleich zur Aktivierung durch SF1-WT alleine als Referenz betrachtet.

Auswertungssoftware und Darstellung der Ergebnisse

Zur Auswertung der Ergebnisse werden die Programme Microsoft Excel und GraphPad Prism6 verwendet.

Die Umrechnung der Rohwerte in Fold change und prozentuale Wildtypaktivität erfolgt mithilfe von Microsoft Excel. Die statistische Auswertung der Daten in Form der Prüfung der Normalverteilung und Ermittlung des Signifikanzniveaus sowie die Darstellung der Ergebnisse in Diagrammen erfolgt mit GraphPad Prism6.

Aufgrund der statistischen Auswertung mit Medianen, welche für Ausreißer weniger anfällig sind als der Mittelwert, werden die Ergebnisse in den Darstellungen einheitlich in Medianen mit Interquartilsabständen dargestellt. Je nach Aussage werden die Ergebnisse dabei als L/R-Ratios, Fold change oder prozentualer SF1-Wildtypaktivität angegeben.

3. Ergebnisse

Zielsetzung dieser Dissertation ist eine funktionelle Charakterisierung von sechs verschiedenen heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung. Ebenso werden Interaktionen mit wichtigen Kofaktoren SOX9 und GATA4 betrachtet. Dies erfolgt unter der Fragestellung einer möglichen Korrelation von Genotyp und Phänotyp durch ein optimiertes funktionelles Testsystem.

Da für aussagekräftige Versuche adäquate Kontrollen wichtig sind, sind zunächst die Vorversuche unter 3.1 und 3.2 beschrieben.

3.1. Überprüfung der Expressionsvektoren

Die Konstrukte wurden wie unter 2.2.1 beschrieben in einem pcDNA3-Vektor hergestellt. Die Überprüfung erfolgte durch Sequenzierungen der gesamten Gene. Um auszuschließen, dass eine SF1-Mutation ein doppelt einkloniertes SF1-Insert enthielt, wurde außerdem ein Restriktionslängenmorphismus zur Überprüfung des Bandenmusters durchgeführt (Abbildung 11).

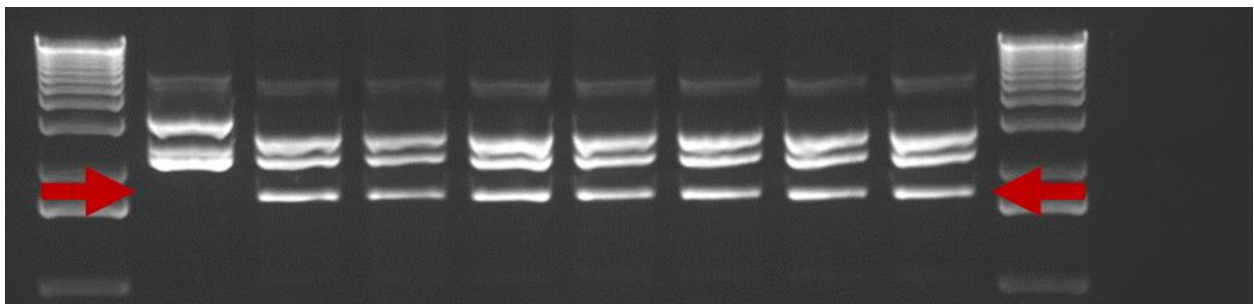


Abbildung 11: Restriktionslängenmorphismus zum Vergleich der Bandenstärke von SF1-WT und SF1-Mutanten. Als Ladder wurde eine 1 Kb Leiter verwendet, sie ist links und rechts im Bild dargestellt, die Höhe des SF1-Inserts (1386 bp) ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Dazwischen sind von links nach rechts dargestellt: Leervektor, SF1-WT, p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C, p.L376F. Eine ähnliche Bandenstärke schließt aus, dass ein doppelt einkloniertes SF1-Insert in dem pcDNA3-Vektor vorliegt. Der Leervektor fungiert als Negativkontrolle.

3.2. Optimierung der dualen Luciferase Assays

Anspruch der Vorversuche war die Protokolloptimierung bei der Methodenetablierung. Dabei sollte zum einen die unspezifische Aktivierung der Vektoren für die adäquate

Auswahl der Leervektor-Kontrolle bestimmt werden. Ebenfalls sollte die Transfektion für die TM4-Zellen etabliert werden.

3.2.1. Auswahl der Negativkontrolle

Eine adäquate Negativkontrolle sollte die gemessenen Aktivierungseffekte durch die Transkriptionsfaktoren nicht verzerren. Ebenso sollten die in der Literatur beschriebenen Synergieeffekte nicht durch eine inadäquate Negativkontrolle oder Versuchsbedingungen beeinträchtigt werden (Tremblay et al., 2001; Tremblay & Viger, 2003). Dies wurde zur Auswahl der Negativkontrolle untersucht.

3.2.1.1. *Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO, CYP11A1- und AMH-Promoter durch 3 verschiedene Negativkontrollen*

Nach dem „Pariser Protokoll“ war als Negativkontrolle der pCS2-Leervektor verwendet worden. Da die SF1-Konstrukte jedoch in einen pcDNA3-Vektor kloniert waren, erschien der pcDNA3-Leervektor als die adäquatere Kontrolle. Ebenso ist eine Kontrolle durch ein unabhängiges Konstrukt, welches keine Interaktionen auf molekularbiologischer Ebene haben sollte, als Leervektor möglich. Um den Leervektor für die folgenden Versuchsreihen auszuwählen, wurde daher ein Vergleich von den pCS2- und pcDNA3-Leervektoren, sowie als eine unabhängige Kontrolle MC4-Rezeptor im pcDNA3-Vektor, ausgewählt. Die Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO sowie des CYP11A1 und AMH-Promoters durch SF1-WT unter Verwendung der verschiedenen Leervektoren wurde bestimmt (Abbildung 12).

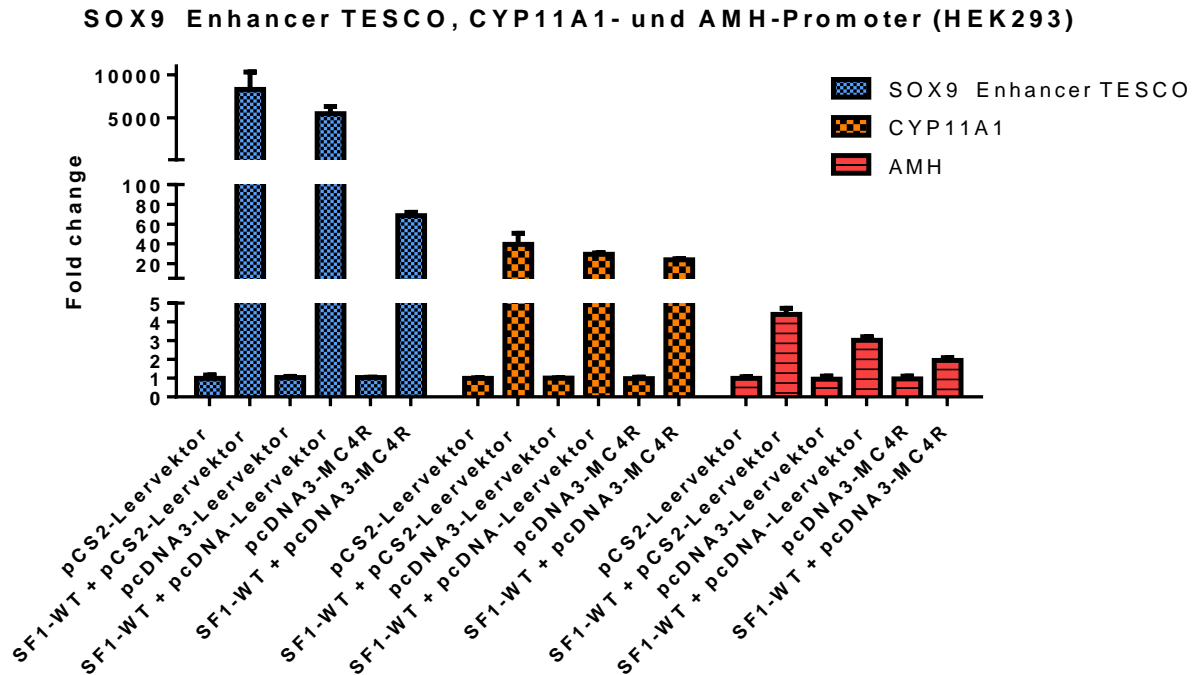


Abbildung 12: Vergleich der Negativkontrollen pCS2-Leervektor, pcDNA3-Leervektor und pcDNA3-MC4R-Vektor in HEK293-Zellen (n=1). Messung der Aktivierung von SOX9 Enhancer TESCO (blau), CYP11A1 (Orange) und AMH-Promoter (rot) durch SF1-WT mit den unterschiedlichen Negativkontrollen als jeweilige Referenz. Dargestellt ist die Fold Change mit Median und Interquartilsabständen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Segmente geteilt. Replikate = n.

Der Vergleich der Negativkontrollen verdeutlicht die Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch unspezifische Aktivierung der Promotoren von pCS2-Leervektor, pcDNA3-Leervektor und pcDNA3-MC4R-Vektor. Je höher die Fold Change des SF1-Wildtyps, desto geringer die unspezifische Aktivierung, da die Negativkontrolle für die Fold Change als mathematische Referenz dient: Der SF1-Wildtyp ist über den Leervektor gerechnet (für alle Promotoren Signifikanzniveau $p < 0,0001$, Mittelwert der L/R-Ratios für den pCS2-Leervektor: 0,00078, für den pcDNA3-Leervektor: 0,0017, für den MC4R-Vektor: 0,012). Der pcDNA-MC4R-Vektor weist die größte unspezifische Aktivierung für alle drei Promotoren auf. Das Aktivierungsniveau durch den SOX9 Enhancer TESCO (Fold Change von SF1 für TESCO: pCS2 8620, pcDNA 5634, MC4R 69,4) ist für alle Leervektoren am höchsten, gefolgt von CYP11A1 (Fold Chance von SF1 für CYP11A1: pCS2 41,4, pcDNA 29,5, MCR4 22,9) und AMH (Fold Chance von SF1 für AMH: pCS2 4,3, pcDNA 3, MRC4 1,9). Der pCS2-Leervektor weist die geringste unspezifische Aktivierung auf, gefolgt von dem pcDNA3-Leervektor.

3.2.1.2. AMH-Synergie bei den verschiedenen Leervektoren

Dieser Vorversuch wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die Synergie-Effekte am Beispiel von SF1 und GATA4 auf den Promoter AMH bei allen 3 Leervektoren nachweisen lassen. Synergieeffekte sind definiert als Aktivierungseffekte durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren bei Kotransfektion, welche größer sind als die additive Aktivierung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren alleine (gezeigt für AMH-Promoter mit pCS2-Leervektor). Eine adäquate Negativkontrolle sollte diese in der Literatur gesicherten Synergieeffekte nicht beeinflussen (Tremblay et al., 2001; Tremblay & Viger, 2003).

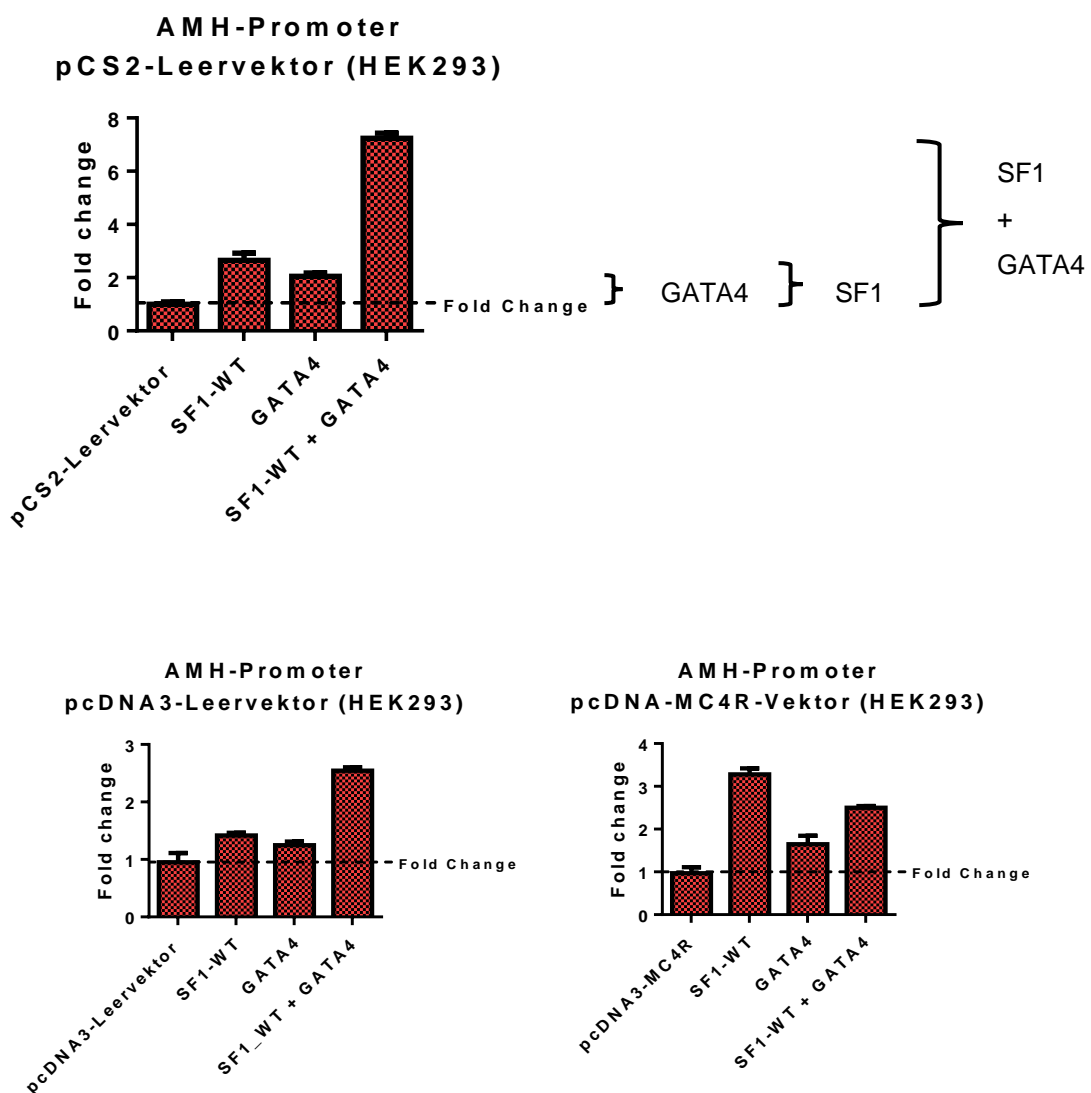


Abbildung 13: Untersuchung des Synergie-Effektes von SF1-WT und GATA4 auf den AMH-Promoter mit den verschiedenen Negativkontrollen pCS2-Leervektor, pcDNA3-Leervektor und pcDNA3-MC4R-Vektor in HEK293-Zellen (n=1). Dargestellt

ist die Fold Change mit Median und Interquartilsabständen. Für den pCS2-Leervektor ist beispielhaft der Synergieeffekt von SF1-WT und GATA4 dargestellt. Replikate = n.

Die Synergieeffekte von SF1-WT und GATA4 sind bei den Negativkontrollen pCS2- (pCS2 Aktivierungseffekt über Fold: SF1 1,7, GATA4 1,0, SF1 + GATA4: 6,1), und pcDNA3-Leervektor (pcDNA Aktivierungseffekt über Fold: SF1 0,4, GATA4 0,3, SF1 + GATA4: 1,6) nachzuvollziehen, nicht jedoch bei dem pcDNA3-MC4R-Vektor (pcDNA3-MC4R Aktivierungseffekt über Fold: SF1 2,2, GATA4 0,7, SF1 + GATA4 =1,5) (Abbildung 13).

3.2.2. Transfektionseffizienz

Das Protokoll war für die HEK293-Zellen bereits transfektionsoptimiert und wurde standardisiert mit 0,3µl Fugene/well verwendet. Aufgrund der Etablierung der Transfektion für die TM4-Zellen erfolgt eine funktionelle Kontrolle der Transfektionseffizienz mit dem Leervektor und SF1-WT durch eine Fugene-Mengen-Titration von 0,1 µl bis 0,6 µl für den am niedrigsten aktivierten AMH-Promoter.

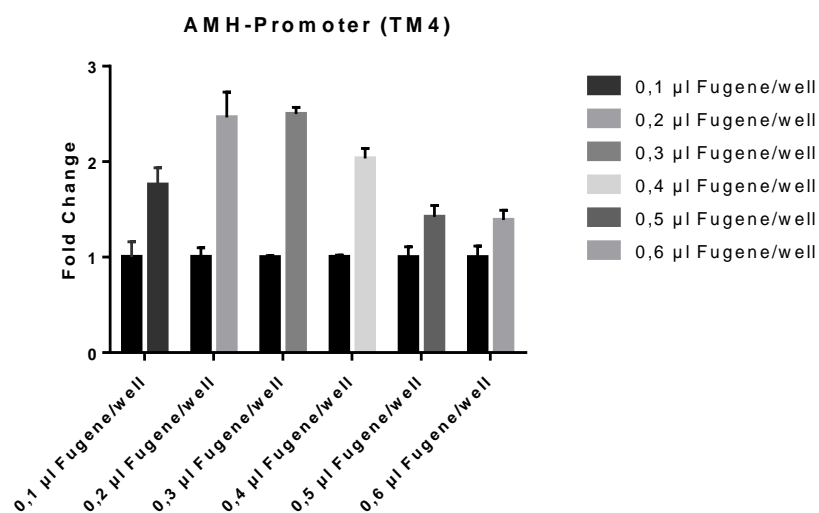


Abbildung 14: Transfektionseffizienz: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT bei Transfektion mit Fugene-Mengen von 0,1 µl bis 0,6 µl in TM4-Zellen (n=1). Dargestellt ist die Fold change von SF1 bei verschiedenen Fugene Mengen (grau schattiert) über den jeweiligen Leervektoren (schwarz) mit Median und Interquartilsabstand. Replikate = n.

Da sich hierbei ebenfalls eine maximale Aktivierungsfähigkeit und damit eine optimale Transfektionseffizienz bei einem Einsatz von 0,3 µl Transfektionsreagenz Fugene zeigt,

wird das Protokoll entsprechend adaptiert (Fold von SF1-WT für Fugene 0,1µl: 1,8, Fugene 0,2µl: 2,5 [p=0,006], Fugene 0,3µl: 2,5 [p=0,0001], Fugene 0,4µl: 2, Fugene 0,5µl: 1,4, Fugene 0,6µl: 1,4) (Abbildung 14).

3.2.3. Konzentrations-Wirkungskurven

Bei Kotransfektionen von Transkriptionsfaktoren sollen bis zu 3 Transkriptionsfaktoren mit gleichen DNA-Mengen eingesetzt werden und das ursprüngliche Protokoll dahingehend abgeändert werden (vgl. Tabelle 27). Die Gesamtmenge 21 ng der zu transfizierenden DNA wird dabei nicht verändert, da der Leervektor entsprechend angepasst wird.

Tabelle 27: Transfektionsschema für eine unterschiedliche Anzahl an Transkriptionsfaktoren. In [Klammern] die transfizierte Menge des ursprünglichen Protokolls.

Anzahl der untersuchten Transkriptionsfaktoren	DNA-Menge je Transkriptionsfaktor (ng)	DNA-Menge Leervektor (ng)	Summe (ng)
1	7 [10]	14 [11]	21
2	7 [10]	7 [1]	21
3	7 [7]	0	21

Im Rahmen der Methodenetablierung werden daher Konzentrations-Wirkungskurven untersucht, um die Aktivierungsunterschiede der vermuteten phänotypisch relevanten Enhancer/Promotoren SOX9 Enhancer TESCO und CYP11A1 durch SF1-WT und SF1-Mutanten bei unterschiedlich eingesetzten DNA-Konzentrationen nachzuvollziehen. Zusätzlich lässt sich dabei ein Dosiseffekt überprüfen, durch den gegebenenfalls ein partieller Funktionsverlust bei Mutanten des Transkriptionsfaktors SF1 durch vermehrte Proteinbiosynthese ausgeglichen werden könnte. Dies könnte als potentielle Ressource in vivo eine Rolle spielen. Im Folgenden sind die Konzentrationswirkungskurven von Mutanten mit nahezu vollständigem Funktionsverlust und damit niedrigem Aktivierungsniveau getrennt von den Mutanten mit partiellem oder keinem Funktionsverlust (WT-like) und damit moderatem bis hohem Aktivierungsniveau gezeigt (Abbildung 15, Abbildung 16).

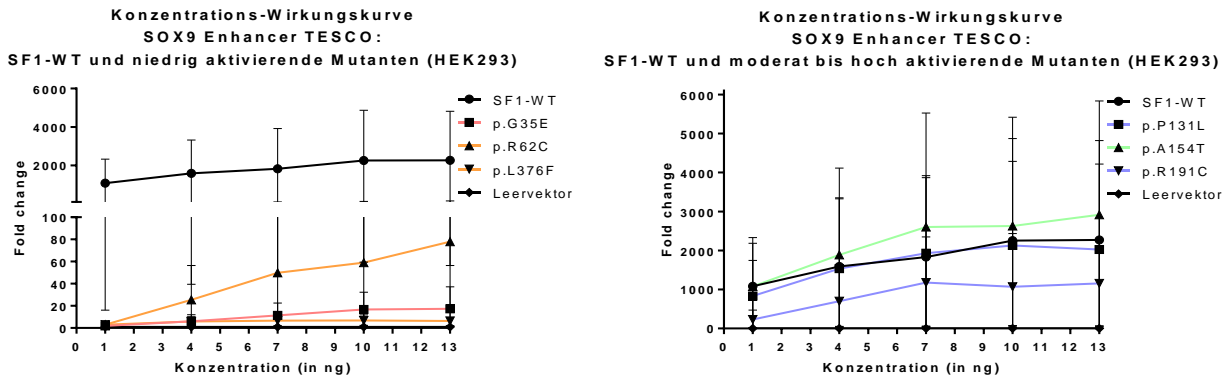


Abbildung 15: Konzentrationswirkungskurven von SF1-WT und SF1-Mutanten: Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO in Konzentrationen von 1 – 13 ng in HEK293-Zellen (n=2). Zur besseren Übersichtlichkeit sind links niedrig aktivierende Mutanten (p.G35E mit kompletter Gonadendysgenese mit roter Ausgleichsline sowie p.R62C und p.L376F mit partieller Gonadendysgenese in orangener Linie) und rechts moderat bis hoch aktivierende Mutanten (p.P131L und p.R191C mit Infertilität in blauer Linie sowie p.A154T in grüner Linie) jeweils mit dem SF1-WT (schwarze Linie) und Leervektor (schwarze Linie) getrennt dargestellt. Angaben der Fold change in Medianen mit Interquartilsabständen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse bei den niedrig aktivierenden Mutanten in zwei Segmente geteilt. Replikate = n.

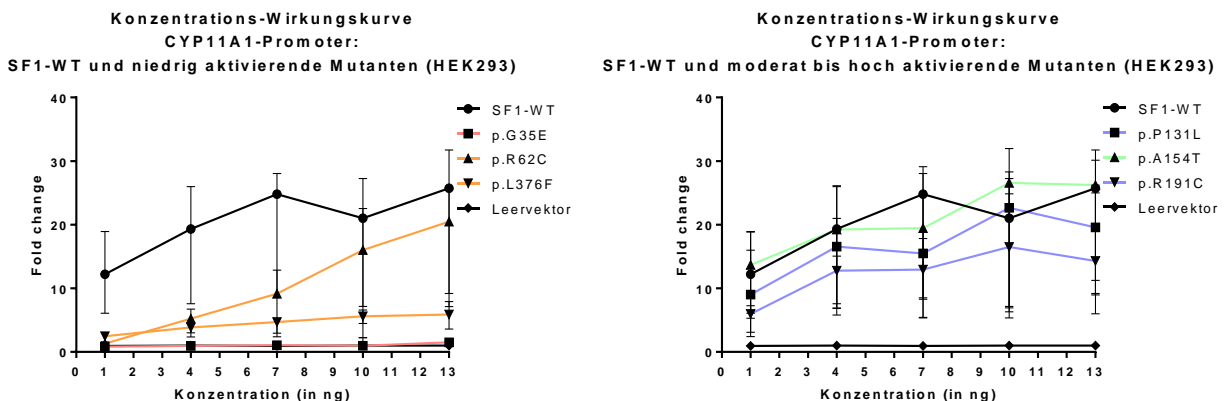


Abbildung 16: Konzentrationswirkungskurve von SF1-WT und SF1-Mutanten: Aktivierung des CYP11A1-Promoters in Konzentrationen von 1 – 13 ng in HEK293-Zellen (n=4). Zu besseren Übersichtlichkeit sind links niedrig aktivierende Mutanten (p.G35E mit kompletter Gonadendysgenese in rot sowie p.R62C und p.L376F mit partieller Gonadendysgenese in orange) und rechts moderat bis hoch aktivierende Mutanten (p.P131L und p.R191C mit Infertilität in blau sowie p.A154T in grün) jeweils mit dem SF1-WT (schwarze Linie) und Leervektor (schwarze Linie) getrennt dargestellt. Angaben der Fold change in Medianen mit Interquartilsabständen. Replikate = n.

Ergebnisse für die niedrig aktivierenden Mutanten p.G35E, p.R62C und p.L376F

Die Mutanten p.G35E und p.L376F zeigen keine wesentliche Änderung ihrer Aktivierungsfähigkeit in steigender Dosierung der DNA-Konzentration, die

Ergebnisse, Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch p.R62C und p.A154T

Ausgleichskurven stellen ein Plateau dar. Dagegen ist für p.R62C mit zunehmender Konzentration sowohl für den SOX9 Enhancer TESCO als auch für den CYP11A1-Promoter ein Anstieg zu verzeichnen. In hohen Konzentrationen ist die Fold change von p.R62C dabei für den CYP11A1-Promoter moderat niedriger als die Wildtyp-Aktivierung (Fold change bei 13 ng DNA: SF1-WT 25,72, p.R62C 20,48), für den TESCO-Promoter deutlich niedriger als die Wildtyp-Aktivierung (Fold change bei 13 ng DNA: SF1-WT 2270, p.R62C 77,96). Die Ausgleichskurve des Wildtyps wird also in den verwendeten Konzentrationen bei beiden Promotern durch p.R62C nicht geschnitten.

Ergebnisse für die moderat bis hoch/WT-like aktivierenden Mutanten p.P131L, p.A154T und p.R191C

Bei beiden Promotern weist p.R191C einen leichten Anstieg bei zunehmenden DNA-Konzentrationen auf, erreicht jedoch nicht das Aktivierungsniveau des Wildtyps. In hohen Konzentrationen ist die Fold change von p.R191C dabei für den CYP11A1-Promoter moderat niedriger als die Wildtyp-Aktivierung (Fold change bei 13 ng DNA: SF1-WT 25,72, p.R191C 14,31), für den TESCO-Promoter ebenfalls (Fold change bei 13 ng DNA: SF1-WT 2270, p.R191C 1156). Die Mutanten p.A154T und p.P131L schneiden bei dem SOX9 Enhancer TESCO und dem CYP11A1-Promoter die Ausgleichskurve des Wildtyps bei unterschiedlichen Konzentrationen. Bei dem CYP11A1-Promoter schneidet p.A154T den SF1-WT zwischen 7 ng und 10 ng und bleibt bei hoher Konzentration auf Höhe des WT. Die Mutation p.P131L dagegen schneidet den Wildtyp bei 10 ng, bei 13 ng liegt die Mutante dagegen wieder unter der Aktivierung des Wildtyps. Bei dem SOX9 Enhancer TESCO liegt die Aktivierung durch p.A154T stetig im Bereich des Wildtyps. Die Mutation p.P131L schneidet den SF1-WT bei 7 ng, die Werte liegen bei höheren Konzentrationen wieder unter der Ausgleichskurve des Wildtyps.

3.3. Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch p.R62C und p.A154T

Die primären funktionellen Analysen der SF1-Mutationen p.R62C und p.A154T, welche in einer ägyptischen Kohorte neu diagnostiziert wurden, erfolgten als Single Assays nach dem „Pariser Protokoll“ mit dem pCS2-Leervektor.

Die Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO als Marker der Testisdeterminierung, des CYP11A1-Promoters als Marker der Leydigzellfunktion und des AMH-Promoters als

Ergebnisse, Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch p.R62C und p.A154T

etablierter Marker der Sertolizellfunktion durch SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten p.R62C und p.A154T wurden untersucht. Als Referenz dient die Mutante p.G35E. Die Ergebnisse sind in relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen dargestellt.

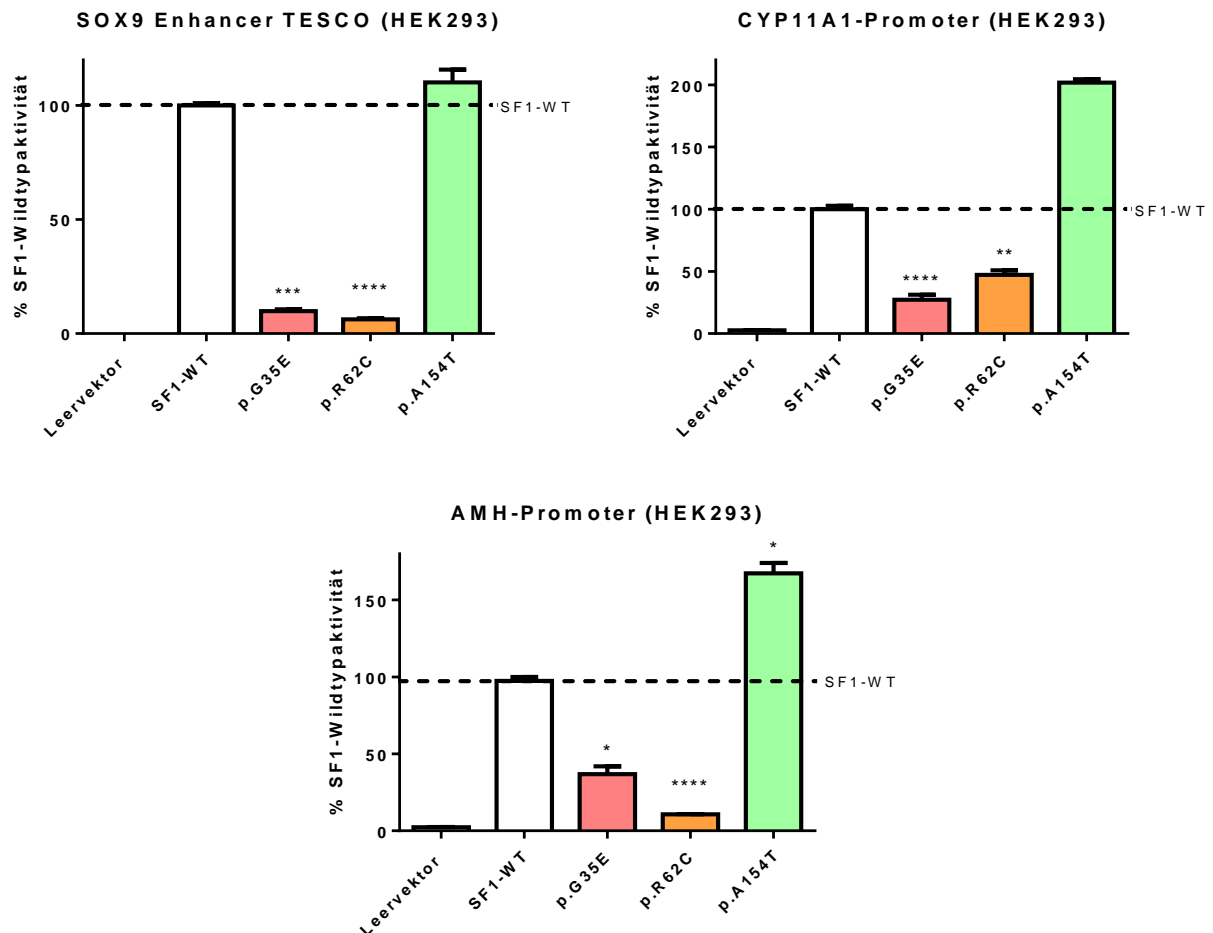


Abbildung 17: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO (n=2), CYP11A1-Promoter (n=2) und AMH-Promoter (n=3) durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C und p.A154T in HEK293-Zellen. SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der 100-prozentigen SF1-Wildtypaktivität ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Das Signifikanzniveau mit SF1-WT als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$. SF1-WT liegt mit $p < 0,0001$ über dem Leervektor (pCS2). Replikate = n.

Die Mutationen p.G35E und p.R62C, welche zu einem schweren Phänotyp mit kompletter bzw. partieller Gonadendysgenese führen, zeigen für den SOX9 Enhancer TESCO einen starken, signifikanten Funktionsverlust im Vergleich zum SF1-WT (Abbildung 17): p.G35E 9,8% WTA und p.R62C 6,2% WTA. Für CYP 11A1 zeigen die SF1-Mutanten p.G35E und p.R62C einen signifikanten starken bis moderaten Funktionsverlust im Vergleich zum Wildtyp (WTA: p.G35E 27,3%, p.R62C 47,2%). Ebenfalls für AMH zeigen die Mutationen p.G35E und p.R62C einen deutlichen bis moderaten Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp (WTA: p.G35E 36,9%, p.R62C 10,7%).

Im Gegensatz dazu weist die Mutante p.A154T mit dem milden Phänotyp der Hypospadie eine ähnliche Aktivierung wie der SF1-WT für den SOX9 Enhancer TESCO auf (WTA: p.A154T 110,1%) bzw. eine erhöhte Aktivierung für CYP11A1- und AMH-Promoter (WTA: p.A154T 201,8%, AMH: p.A154T 167,3%).

Die Leervektoraktivität des pCS2-Vektors ist sehr gering (WTA, TESCO: Leervektor 0,1%, CYP11A1: Leervektor 2,6%, AMH: Leervektor 2,4%).

3.4. Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch SF1-Mutationen sowie Kotransfektionen

Die Hauptversuche sind im Folgenden nach dem SOX9 Enhancer TESCO sowie CYP11A1- und AMH-Promotor gegliedert.

Die Versuche erfolgten nach dem „Berliner Protokoll“ mit dem pcDNA3-Leervektor.

Für den SOX9 Enhancer TESCO wurden neben den einfachen Luciferase Assays, welche die Aktivierung des Promoters durch den SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten darstellen, ebenfalls Synergie-Assays durchgeführt. Dabei wurde die Aktivierung von SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten mit dem bekannten Kofaktor SOX9 untersucht. Die Interaktionseffekte wurden dabei ebenfalls gesondert analysiert. Zusätzlich wurden Untersuchungen auf einen dominant-negativen Effekt durchgeführt.

Für den CYP11A1-Promoter wurden einfache Luciferase Assays durchgeführt.

Für den AMH-Promoter wurden einfache Luciferase Assays und Synergie-Assays mit dem Kofaktor GATA 4 untersucht.

Für alle Versuche ergab der Kruskal-Wallis-Test signifikante Gruppenunterschiede mit $P < 0,0001$. Die Ergebnisse sind in relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen dargestellt.

3.4.1. SOX9 Enhancer TESCO als Marker der Testisdeterminierung

3.4.1.1. Einfache Luciferase Assays: Aktivierungsfähigkeit des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutanten

Im ersten Schritt wurden für den SOX9 Enhancer TESCO als Marker der Testisdeterminierung dessen Aktivierungsfähigkeit durch den SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten untersucht (Abbildung 18).

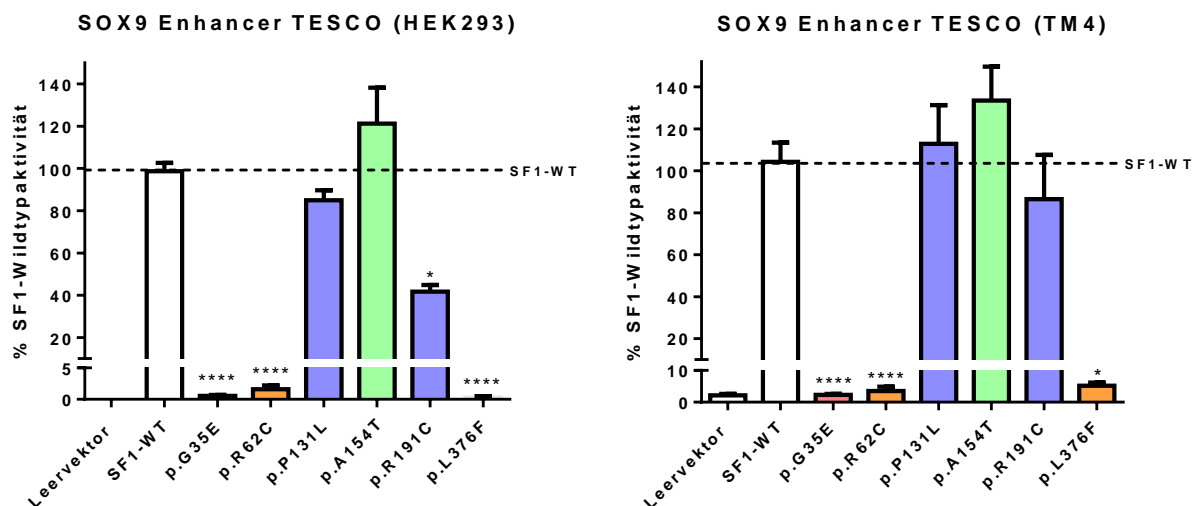


Abbildung 18: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=5) und Sertolizellen (TM4, n=3). SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der 100-prozentigen SF1-Wildtypaktivität ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Segmente geteilt. Das Signifikanzniveau mit SF1-WT als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001, **** = P<0,0001. SF1-WT liegt jeweils mit p<0,0001 über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

Die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F, welche zu einem schweren Phänotyp mit kompletter oder partieller Gonadendysgenese führen, zeigen in beiden Zelllinien einen starken, signifikanten Funktionsverlust im Vergleich zum SF1-WT (Abbildung 18): WTA in HEK293: p.G35E 0,5%, p.R62C 1,6%, p.L376F 0,3%; in TM4: p.G35E 2,3%, p.R62C 3,5%, p.L376F 5,2%. Im Gegensatz dazu weisen die Mutanten p.P131L und p.R191C mit

weniger betroffenen Phänotypen (Infertilität) lediglich einen moderaten Funktionsverlust (WTA in HEK293: p.P131C 84,9%, p.R191C 41,7%, nur für p.R191C signifikant), oder eine Aktivierung ähnlich dem Wildtyp (WTA in TM4: p.P131C 112,8%, p.R191C 86,6%) auf. Die Variante p.A154T zeigt in beiden Zelllinien eine ähnliche Aktivierung wie der SF1-WT ohne signifikante Erhöhung (WTA in HEK293 121,2%; in TM4 133,5%). Die Leervektoraktivität ist in beiden Zellreihen sehr gering (WTA, HEK293: Leervektor 0%, TM4: Leervektor 2,1%).

3.4.1.2. Synergie Assays: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutanten mit dem Interaktionspartner SOX9

In Synergie-Assays wurde die Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO durch SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten mit dem bekannten Interaktionspartner SOX9 untersucht sowie deren Interaktion analysiert.

Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch Interaktionen von SF1-WT und SF1-Mutanten mit SOX9

Zunächst wurde die Steigerung der Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch Interaktionen von SF1-Mutanten und SOX9 mit der Aktivierung durch Interaktionseffekte von SF1-WT und SOX9 verglichen (Abbildung 19).

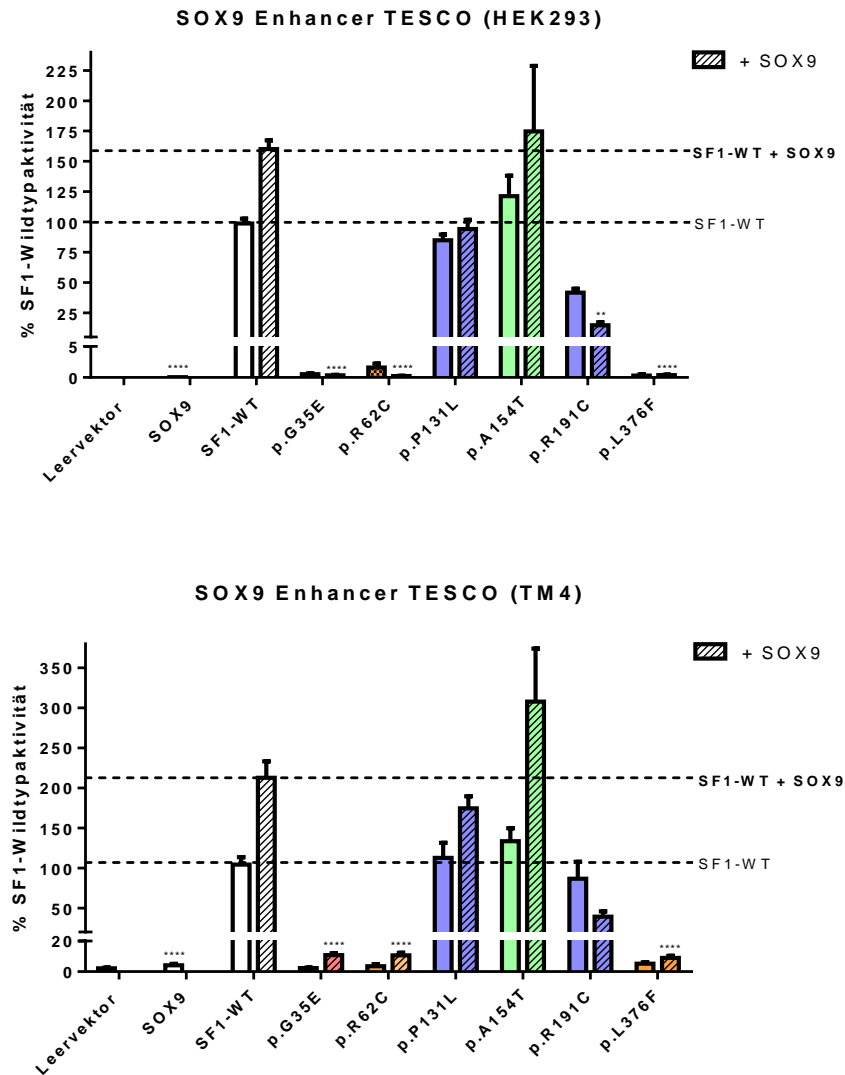


Abbildung 19: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner SOX9 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3). Die einfachen Transfektionen zeigen einen leeren Balken ohne Muster, die Kotransfektionen mit SOX9 ein diagonal-gestreiftes Muster. SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die TESCO-Aktivierung durch SF1-WT und SF1-WT mit SOX9 (Referenz) sind als gestrichelte Linien parallel zur X-Achse eingezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Segmente geteilt. Das Signifikanzniveau mit der TESCO-Aktivierung durch SF1-WT mit SOX9 als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001, **** = P<0,0001. SF1-WT liegt jeweils mit p<0,0001 über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

Synergieeffekte sind definiert als Aktivierungseffekte durch die Interaktion von Transkriptionsfaktoren bei Kotransfektion, welche größer sind als die additive Aktivierung der jeweiligen Transkriptionsfaktoren alleine.

Es liegt ein signifikanter Synergie-Effekt vor: Während SOX9 alleine eine geringe Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO zeigt (WTA SOX9 in HEK293: 0%, in TM4: 4,2%), zeigt sich in Kotransfektion mit dem Wildtyp eine deutliche Steigerung (WTA SF1-WT mit SOX9 in HEK293: 160,2%, in TM4: 212,7%). Die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F zeigen in beiden Zelllinien auch mit dem Interaktionspartner SOX9 einen starken, signifikanten Funktionsverlust im Vergleich zur Aktivierungsfähigkeit von SF1-WT mit SOX9 (WTA, Kotransfektionen mit SOX9 in HEK293: p.G35E 0,4%, p.R62C 0,2%, p.L376F 0,4%; in TM4: p.G35E 10,8%, p.R62C 10,7%, p.L376F 9,1%). Die Mutanten p.P131L und p.R191C zeigen mit SOX9 eine geringere Aktivierung als SF1-WT mit SOX9, welche lediglich für p.R191C in HEK293-Zellen signifikant ist (WTA, Kotransfektionen mit SOX9 in HEK293: p.P131L 94,1%, p.R191C 14,8%; in TM4: p.P131L 174,4%, p.R191C 39,1%). Die Mutante p.A154T mit SOX9 zeigt in beiden Zelllinien eine ähnliche Aktivierung wie der SF1-WT und hat somit keinen signifikanten Interaktionseffekt (WTA, p.A154T mit SOX9 in HEK293: 174,6%, in TM4: 307,9%). Die Leervektoraktivität ist gering (WTA, HEK: Leervektor 0%, TM4: Leervektor 2,1%).

Interaktionsanalyse von SF1 und SOX9

Um die Interaktionen von SF1-WT und der Mutanten mit dem Kofaktor SOX9 genauer zu klassifizieren, wurden die zusätzlichen Aktivierungseffekte des SOX9 Enhancers TESCO durch SOX9 für den SF1-WT und die SF1-Mutanten analysiert (Abbildung 20).

Grundvoraussetzung ist der nachgewiesene Synergieeffekt von SOX9 mit SF1-WT.

Zunächst wird von allen Rohdaten der Mittelwert des Leervektors subtrahiert. Der nonparametrische Mann Whitney Test ergibt nachfolgend einen zweiseitigen p-Wert von <0,0001. Referenz für die weitere statistische Auswertung ist die Größe des Synergieeffektes von SOX9 mit SF1-WT.

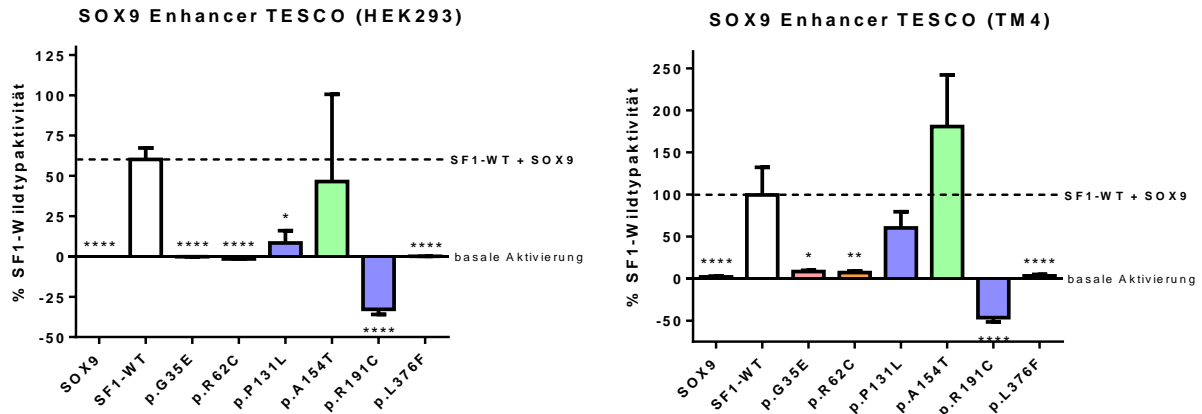


Abbildung 20: Interaktionsanalyse von SF1-WT und den SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner SOX9 auf SOX9 Enhancer TESCO in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3). Für die Darstellung und Auswertung wurde von allen Rohdaten der Leervektor subtrahiert. Zum einen ist die alleinige Aktivierung des TESCO-Promoters durch SOX9 dargestellt (schwarzer Balken). Außerdem wurde die alleinige zusätzliche Aktivierung des TESCO-Promoters durch SOX9 für den Wildtyp berechnet (Differenz der Aktivierung von SF1-WT mit SOX9 und der Aktivierung durch SF1-WT alleine, weißer Balken). Entsprechend wurde mit den SF1-Mutanten verfahren und den Balken entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der zusätzlichen TESCO-Aktivierung des SF1-Wildtyps durch Synergie mit SOX9 ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Das Signifikanzniveau mit der Referenz SOX9-Interaktionseffekt von SF1-WT wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$. Replikate = n.

SOX9 zeigt mit SF1-WT einen Synergieeffekt in beiden Zelllinien (HEK293: +61,5%; TM4: +108,4%). Die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F zeigen in beiden Zelllinien mit dem Kofaktor SOX9 keinen Interaktionseffekt (WTA in HEK293: p.G35E -0,1%, p.R62C -1,4%, p.L376F +0,1%; in TM4: p.G35E +8,6%, p.R62C +7,2%, p.L376F +3,9%). Die Mutante p.P131L verhält sich unterschiedlich in den beiden Zelllinien (WTA in HEK293: +9,2%, in TM4: +61,6%), der Interaktionseffekt ist in den HEK293-Zellen signifikant erniedrigt. Die Mutante p.R191C zeigt mit SOX9 einen signifikanten Aktivitätsverlust in beiden Zelllinien (WTA in HEK293: -26,9%, in TM: -47,5%). Der Synergieeffekt der Variante p.A154T ist in beiden Zelllinien nicht eingeschränkt (WTA in HEK293: p.A154T +53,4%; in TM4: p.A154T +174,5%).

Zusammengefasst besteht bei allen Mutanten mit Ausnahme von p.A154T ein eingeschränkter Synergieeffekt.

3.4.1.3. Prüfung eines dominant-negativen Effektes

Um die vermuteten dominant-negativen Effekte der SF1-Mutanten auf den SF1-WT zu untersuchen, wurden sowohl einfache (Kotransfektion von SF1-Mutanten mit dem SF1-WT) als auch synergistische (Kotransfektion von SF1-Mutanten mit SOX9 und dem SF1-WT) dominant-negative Assays durchgeführt.

Einfache dominant-negative Assays

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Kotransfektion von SF1-Mutanten mit dem SF1-WT dargestellt (Abbildung 21).

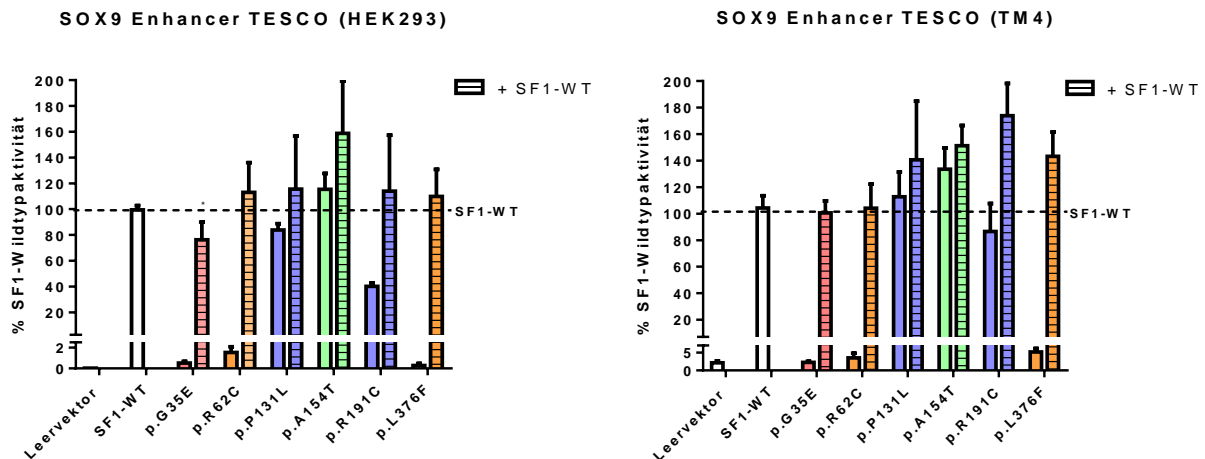


Abbildung 21: Einfacher dominant-negativer Assay: Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO durch SF1-WT sowie die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit SF1-WT in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3). Die einfachen Transfektionen zeigen einen leeren Balken ohne Muster, die Kotransfektionen mit SF1 ein horizontal-gestreiftes Muster. SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung durch SF1-WT ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Segmente geteilt. Das Signifikanzniveau mit der SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung durch SF1-WT als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = P<0,05, ** = P<0,01,

*** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$. SF1-WT liegt jeweils mit $p < 0,0001$ über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

In den einfachen dominant-negativen Assays lassen sich in HEK293- und TM4-Zellen keine dominant negativen Effekte nachweisen, bei denen eine deutliche Beeinträchtigung der TESCO-Aktivierung von SF1-WT durch die SF1-Mutanten vorliegen müsste (Abbildung 21). Alle SF1-Mutanten in Kotransfektion mit SF1-WT weisen eine ähnliche Aktivierung wie SF1-WT auf. Einzig für p.G35E zeigt sich eine gering niedrigere Aktivierung (WTA in HEK293: p.G35E 76,2%, p.R62C 113%, p.P131L 115,5%, p.A154T 158,7%, p.R191C 114%, p.L376F 109,8%; in TM4: p.G35E 100,5%, p.R62C 104,1%, p.P131L 140,6%, p.A154T 151,3%, p.R191C 174%, p.L376F 143,2%). Die Leervektoraktivität ist niedrig (WTA in HEK293: Leervektor 0%, in TM4: Leervektor 2,1%).

Dominant-negative Synergie-Assays

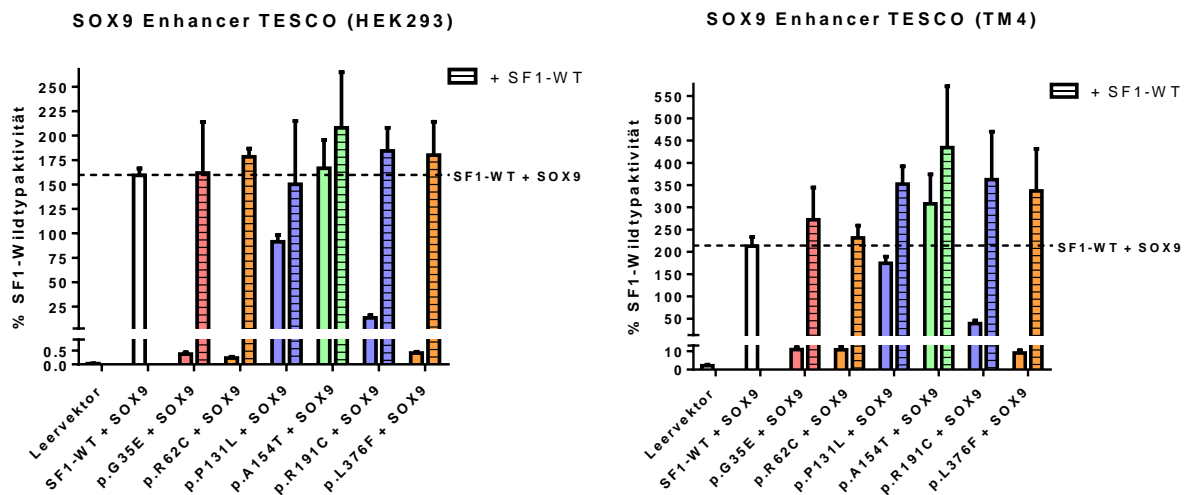


Abbildung 22: Dominant-negativer Synergie-Assay: Aktivierung des SOX9 Enhancer TESCO durch SF1-WT mit dem Interaktionspartner SOX9 sowie die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit SF1-WT und SOX9 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=3). Die einfachen Transfektionen zeigen einen leeren Balken ohne Muster, die Kotransfektionen mit SOX9 ein horizontal-gestreiftes Muster. SF1-WT mit SOX9 sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung durch SF1-WT mit SOX9 ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Y-Achse in zwei Segmente geteilt. Das

Signifikanzniveau mit der SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung durch SF1-WT mit SOX9 als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$. SF1-WT liegt jeweils mit $p < 0,0001$ über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

In den dominant-negativen Synergie-Assays lassen sich in beiden Zelllinien keine dominant negativen Effekte nachweisen, bei denen eine deutliche Beeinträchtigung der TESCO-Aktivierung von SF1-WT mit SOX9 durch die SF1-Mutanten vorliegen müsste (Abbildung 22). Alle SF1-Mutanten in Kotransfektion mit SF1-WT und SOX9 weisen eine ähnliche oder höhere Aktivierung als der SF1-WT mit SOX9 auf, keine niedrigere. (WTA, Kontransfektion mit SOX9 in HEK293: SF1-WT 159,4%, p.G35E 161,8%, p.R62C 178,2%, p.P131L 150,2%, p.A154T 207,9%, p.R191C 184,2%, p.L376F 180%; in TM4: SF1-WT 212,7%, p.G35E 272,3%, p.R62C 233%, p.P131L 352,1%, p.A154T 434,3%, p.R191C 362,4%, p.L376F 336,9%). Die Leervektoraktivität ist niedrig (WTA in HEK293: Leervektor 0%, in TM4: Leervektor 2,1%).

3.4.2. CYP11A1-Promoter als Marker der Leydigzellfunktion

3.4.2.1. *Einfache Luciferase Assays: Aktivierungsfähigkeit des CYP11A1-Promoters durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutanten*

Als experimenteller Marker der Leydigzellfunktion wurde der CYP11A1-Promoter auf dessen Aktivierbarkeit durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutanten untersucht (Abbildung 23).

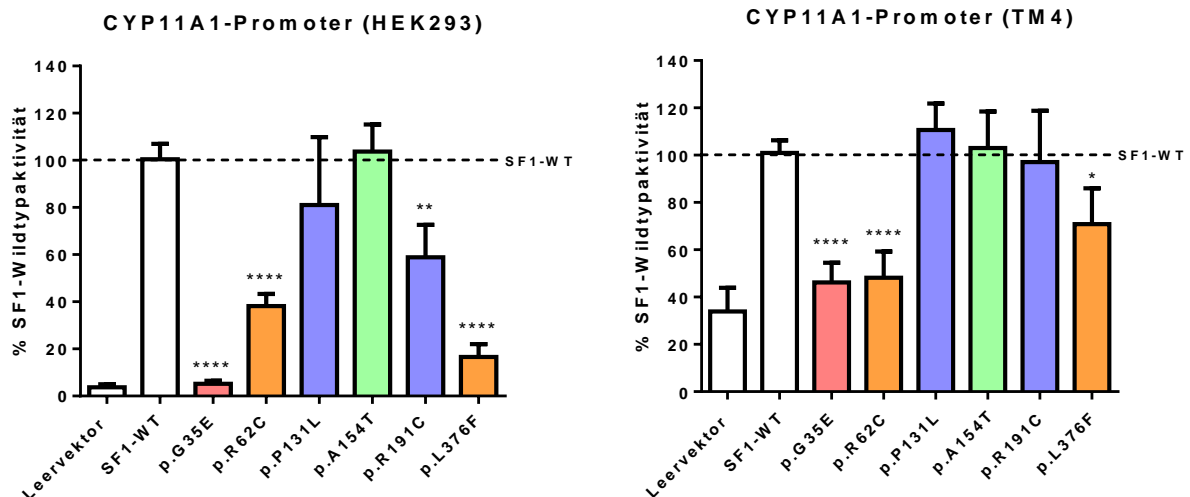


Abbildung 23: Aktivierung des CYP11A1-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=7) und Sertolizellen (TM4, n=5). SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der 100-prozentigen SF1-Wildtypaktivität ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Das Signifikanzniveau mit SF1-WT als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001, **** = P<0,0001. SF1-WT liegt jeweils mit p<0,0001 über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

Die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C und p.L376F zeigen einen signifikanten starken bis moderaten Funktionsverlust im Vergleich zum Wildtyp in beiden Zelllinien (WTA in HEK293: p.G35E 5,2%, p.R62C 38,1%, p.L376F 16,6%; in TM4: p.G35E 46,2%, p.R62C 48,2%, p.L376F 70,8%) (Abbildung 23). Die milderen Phänotypen (p.P131L und p.R191C) sowie p.A154T zeigen keine oder eine nur leicht reduzierte Aktivitätsminderung (WTA in HEK293: p.P131C 81,1%, p.R191C 58,9%, p.A154T 103,7%; in TM4: p.P131C 110,6%, p.R191C 97%, p.A154T 103,1%). Die Leervektoraktivität ist in HEK293 gering (WTA in HEK293: Leervektor 3,7%), in TM4-Zellen mäßig erhöht (WTA in TM4: Leervektor 33,9%).

3.4.3. AMH-Promoter als Marker der Sertolizellfunktion

3.4.3.1. Einfache Luciferase Assays: Aktivierungsfähigkeit des AMH-Promoters durch SF1-Wildtyp und SF1-Mutanten

Der AMH-Promoter als bisher etablierter Marker der Sertolizellfunktion wurde für den SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten im Hinblick auf ihre Aktivierungsfähigkeit untersucht.

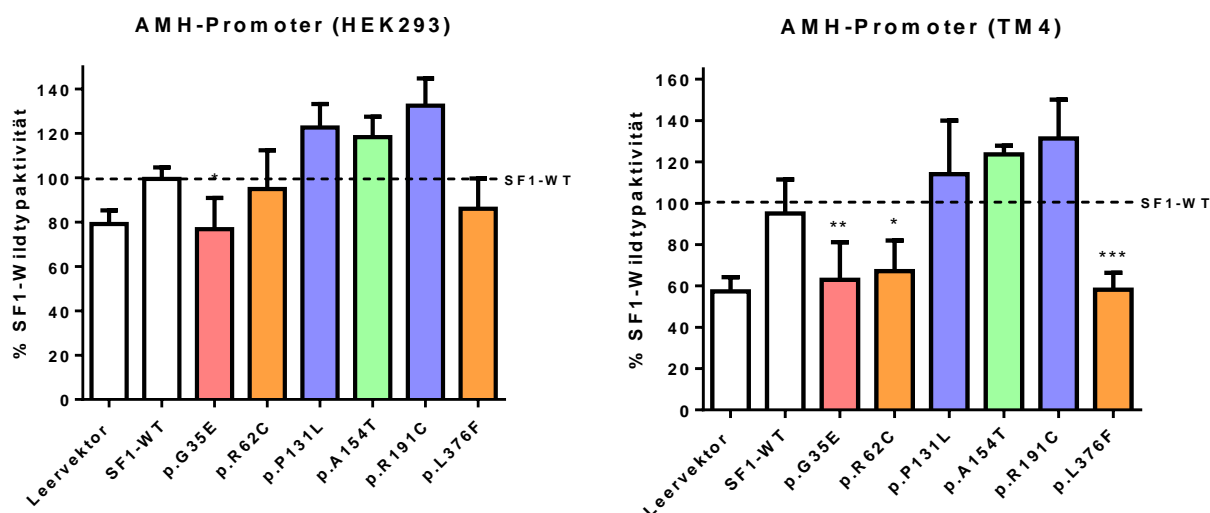


Abbildung 24: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=6). SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die Referenz der 100-prozentigen SF1-Wildtypaktivität ist als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Das Signifikanzniveau mit SF1-WT als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test) berechnet. Signifikanzniveau: * = P<0,05, ** = P<0,01, *** = P<0,001, **** = P<0,0001. SF1-WT liegt bei HEK293-Zellen mit P=0,006, bei den Sertolizellen mit P<0,0001 über dem pcDNA3-Leervektor. Replikate = n.

In beiden Zelllinien ist die Leervektoraktivität deutlich erhöht (WTA in HEK: Leervektor 79,2%, in TM4: Leervektor 57,4%) (Abbildung 24). In TM4-Zellen zeigen die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F eine leicht verringerte Aktivität als der SF1-WT, dieses ist in den HEK293 Zellen nahezu nicht mehr nachzuvollziehen (WTA in TM4: p.G35E 62,9%, p.R62C 67,2%, p.L376F 58,2%; in HEK293: p.G35E 76,9%, p.R62C 94,9%, p.L376F 86%). Einzig für p.G35E, dem Phänotyp mit persistierenden Müller'schen Strukturen, ist

dieses Ergebnis in beiden Zelllinien signifikant. Die Phänotypen mit Infertilität (p.P131C, p.R191C) und Hypospadie (p.A154T) weisen keine reduzierte funktionelle Aktivität in beiden Zellsystemen auf (WTA in HEK293: p.P131C 122,7%, p.R191C 132,5%, p.A154T 118,3%; in TM4: p.P131C 114,1%, p.R191C 131,3%, p.A154T 123,6%).

3.4.3.2. Synergie-Assays: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-Wildtyp und –Mutanten mit dem Interaktionspartner GATA4

In Synergie-Assays wurde die Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-Wildtyp und die SF1-Mutanten mit dem Interaktionspartner GATA4 untersucht.

Aktivierung des AMH-Promoters durch Interaktionen von SF1-WT und -Mutanten mit GATA4

Es wird die Steigerung der Aktivierung des AMH-Promoters durch Interaktionen von SF1-Mutanten und GATA4 mit der Aktivierung durch Interaktionseffekte von SF1-WT und GATA4 verglichen.

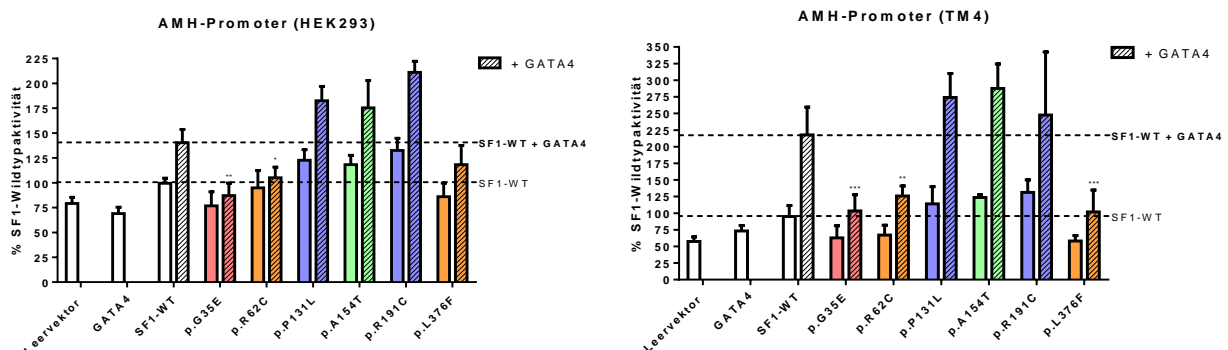


Abbildung 25: Aktivierung des AMH-Promoters durch SF1-WT und die SF1-Mutanten p.G35E, p.R62C, p.P131L, p.A154T, p.R191C und p.L376F mit dem Interaktionspartner GATA4 in HEK293-Zellen (n=4) und Sertolizellen (TM4, n=6). Die einfachen Transfektionen zeigen einen leeren Balken ohne Muster, die Kotransfektionen mit GATA4 ein diagonal-gestreiftes Muster. SF1-WT sowie die Negativkontrolle in Form des Leervektors sind als weiße Balken dargestellt. Den Balken der SF1-Mutanten sind entsprechend des zugehörigen Phänotyps unterschiedliche Farben zugeordnet: p.G35E (komplette Gonadendysgenese) in rot, p.R62C und p.L376F (partielle Gonadendysgenese) in orange, p.P131L und p.R191C (Infertilität) in blau, p.A154T (Hypospadie) in grün. Dargestellt sind die relativen SF1-Wildtypaktivitäten als Mediane mit Interquartilsabständen. Die AMH-Aktivierung durch SF1-WT und SF1-WT mit GATA4 (Referenz) sind als gestrichelte Linie parallel zur X-Achse eingezeichnet. Das Signifikanzniveau mit der AMH-Aktivierung durch SF1-WT mit GATA4 als Referenz wurde nach dem Kruskal-Wallis-Test mit Korrektur für multiple Vergleiche (Dunn's Test)

Ergebnisse, Aktivierungsfähigkeit zentraler Promotoren/Enhancer der Geschlechtsentwicklung durch SF1-Mutationen sowie Kotransfektionen

berechnet. Signifikanzniveau: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$, **** = $P < 0,0001$. SF1-WT liegt bei HEK293-Zellen mit $P = 0,006$, bei den Sertolizellen mit $P < 0,0001$ über dem pcDNA3-Leervektor. GATA4 zeigt in beiden Zelllinien keinen signifikanten Unterschied zum Leervektor. Replikate = n.

Es zeigt sich eine deutlich erhöhte Leervektoraktivität (WTA in HEK293: Leervektor 79,2%, in TM4: Leervektor 57,3%) (Abbildung 25). Der Synergieeffekt ist unter dieser eingeschränkten Verwertbarkeit der Ergebnisse in den TM4-Zellen deutlicher (WTA in TM4: GATA 4 73,1%, SF1-WT + GATA4 = 217,8%; in HEK293: GATA4 69,1%, SF1-WT + GATA4 = 140,3%).

Die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F zeigen in beiden Zelllinien mit dem Interaktionspartner GATA4 einen moderaten Funktionsverlust im Vergleich zum SF1-WT mit GATA4 (WTA, Kotransfektionen mit GATA4 in HEK293: p.G35E 87,1%, p.R62C 105,1%, p.L376F 118,2%; in TM4: p.G35E 103,3%, p.R62C 125,9%, p.L376F 101,9%;). Die Mutanten p.P131L, p.A154T und p.R191C zeigen mit GATA4 in beiden Zelllinien eine ähnliche Aktivierung wie der SF1-WT mit GATA4 (WTA, Kotransfektionen mit GATA4 in HEK293: p.P131C 182,5%, p.A154T 175,3%, p.R191C 211%; in TM4: p.P131C 274%, p.A154T 287,7%, p.R191C 247,6%).

4. Diskussion

SF1-Mutationen führen zu XY-DSD, deren Phänotypen einen unterschiedlichen Grad der Gonadendysgenese, Virilisierung und residuellen Müller'schen Strukturen aufweisen. Zielsetzung der Dissertation ist eine funktionelle Charakterisierung von sechs verschiedenen heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung.

Insgesamt liegt dieser Arbeit die Hypothese zugrunde, dass sich die Mutationen der leichten und schwerer betroffenen Patienten mit XY-DSD in einem optimierten in vitro Testsystem im Hinblick auf die funktionelle Einschränkung der veränderten Proteine unterscheiden. Dabei werden zwei neue SF1-Mutationen funktionell charakterisiert und mit bekannten Mutationen verglichen. Dies erfolgt unter der Fragestellung einer möglichen Korrelation von Genotyp und Phänotyp durch ein optimiertes funktionelles Testsystem. Ebenfalls werden die Ergebnisse der zwei unterschiedlichen Zellsysteme verglichen.

4.1. Validierung der dualen Luciferase Assays

Eine generelle methodische Einschränkung für funktionelle Analysen ist die limitierte Aussagekraft der dualen Luciferase Assays als artifizielles, überexprimiertes System.

Die Effizienz der Transfektion wurde durch eine Fugene-Titration für die TM4-Zellen funktionell überprüft. Für die Versuche wurden relativ niedrige Konzentrationen der DNA gewählt. Um die Vergleichbarkeit der Aktivierungen bei den Kotransfektionen verschiedener Transkriptionsfaktoren zu gewähren, wurden die gleichen DNA-Mengen von bis zu 3 Transkriptionsfaktoren transfiziert (vgl. 3.2.3). Die Konzentrations-Wirkungskurven zeigten ab 7 ng aufwärts keine wesentlichen Unterschiede in der Aktivierung für die verschiedenen DNA-Mengen.

Der im „Pariser Protokoll“ verwendete pCS2-Leervektor wurde bei dem „Berliner Protokoll“ durch den pcDNA3-Leervektor ausgetauscht unter der Vorstellung der adäquateren Leervektorkontrolle. Das unterschiedliche Promoterprofil von verschiedenen Expressionsvektoren in einem Versuchsansatz kann durch die unspezifische Aktivierung der Expressionsvektoren zu einer Verzerrung bei der Interpretation der Ergebnisse führen. Dies zeigt der Vergleich der Aktivierung von SOX9-Enhancer TESCO sowie CYP11A1- und AMH-Promotern durch drei verschiedene Negativkontrollen (Abbildung 12). Während der pCS2-Vektor die niedrigste Aktivierung

aufwies, zeigte der pcDNA-MC4R-Vektor die größte unspezifische Aktivierung aller drei Kontrollvektoren. Dies könnte an einer zusätzlichen Belastung der Zellen durch die Expression des MC4-Rezeptors liegen, welcher mit der experimentellen Zielsetzung in keinem Zusammenhang steht. Anhand dieser Untersuchung erscheint der pcDNA3-Vektor als adäquatere Kontrolle, da die SF1-Konstrukte in ihn kloniert waren und dadurch eine Messung vermeintlich höherer Aktivierungsunterschiede durch einen sehr niedrigen pCS2-Kontrollvektor vermieden wurde. Auch für die Interaktionsanalysen wurden aufgrund der unterschiedlichen unspezifischen Aktivierung verschiedener Vektoren alle Kofaktoren homogen im pcDNA3-Vektor verwendet.

Sowohl bei dem Vergleich der Leervektoren in den Vorversuchen als auch in den Hauptversuchen fällt die unterschiedliche Aktivierungsfähigkeit des SF1-Wildtyps in Relation zum Leervektor von den Promotoren der Geschlechtsentwicklung auf. Der TESCO-Promoter zeigt die höchste Aktivierbarkeit durch SF1 (WTA in HEK293: Leervektor 0%; in TM4: Leervektor 2,1%, vgl. Abbildung 18), gefolgt von dem CYP11A1-Promoter (WTA in HEK293: Leervektor 3,5%, in TM4: 33,9%, vgl. Abbildung 23). Der AMH-Promoter weist die geringste Aktivierung durch SF1 bzw. höchste Leervektoraktivität auf (WTA in HEK293: Leervektor 79,2%, in TM4-Zellen: Leervektor 57,3%, vgl. Abbildung 24). Dementsprechend ist die Aussagekraft für den AMH-Promoter als gering anzusehen.

4.2. Fragestellung 1: Zellsystem

In dieser Arbeit sollten die funktionellen Assays vergleichend in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) im Vergleich zu murinen Sertolizellen (TM4) durchgeführt werden mit den beiden folgenden Fragen:

- Sind die Ergebnisse in beiden Zelllinien konstant?
- Können die TM4 Zellen die physiologischen Gegebenheiten besser nachstellen und sind dadurch sensitiver für funktionelle Unterschiede?

Die Ergebnisse der Hauptversuche sind in beiden Zelllinien ähnlich, aber nicht identisch. Die Ergebnisse der Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F mit den Phänotypen einer kompletten und partiellen Gonadendysgenese sind für den SOX9 Enhancer TESCO und den CYP11A1-Promoter in beiden Zelllinien signifikant (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 23). Die Aktivierungsverluste der Mutationen p.P131L und p.R191C mit dem

Phänotyp der Infertilität sind in den HEK293 Zellen für die Interaktionsanalysen mit dem Kofaktor SOX9 für den SOX9 Enhancer TESCO und ebenfalls für den CYP11A1 Promoter ausgeprägter (Abbildung 20).

Die geringen Aktivierungsverluste für den AMH-Promoter durch die Mutationen p.G35E, p.R62C und p.L376F mit den Phänotypen einer kompletten und partiellen Gonadendysgenese – ebenfalls in Interaktion mit dem Kofaktor GATA4 – sind hingegen in den TM4-Zellen ausgeprägter (Abbildung 24, Abbildung 25). Somit könnte für AMH-Assays angenommen werden, dass TM4-Zellen, welche in vivo ebenfalls AMH produzieren, sensitiver sind für funktionelle Unterschiede als HEK293-Zellen.

Da HEK-Zellen jedoch aus der gleichen humanen Urogenitalanlage wie die Gonaden entstehen und in zahlreichen funktionellen Analysen bereits eingesetzt wurden (Allali et al., 2011; Anu Bashamboo et al., 2010; Lin et al., 2007; N Camats, 2012; Sreenivasan et al., 2018), fungieren sie als aussagekräftiges Modell für in vitro Analysen der Geschlechtsentwicklung. In TM4-Zellen lassen sich zusammenfassend vergleichbare valide Ergebnisse generieren, ggf. sind sie für AMH sensitiver.

4.3. Fragestellung 2: Neue Mutationen

In einer ägyptischen Kohorte aus Patienten mit XY-DSD wurden neue SF1-Mutationen gefunden. Von diesen Mutationen sollten die Mutationen p.R62C und p.A154T, die mit unterschiedlichem Phänotyp beschrieben sind, in dieser Arbeit zum ersten Mal funktionell charakterisiert werden.

Zu diesen beiden neu diagnostizierten Mutationen sollen die beiden folgenden Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich signifikante Aktivierungsunterschiede der relevanten Promotoren der Geschlechtsentwicklung feststellen im Vergleich zum Wildtyp?
- Ist die Mutation p.A154T des gering ausgeprägten Phänotyps der Hypospadie mit einem fertilen Vater, welcher ebenfalls Träger der Mutation ist, überhaupt funktionell relevant?

Während der Patient mit der Mutation p.R62C eine partielle Gonadendysgenese mit verminderter Sertolizellfunktion und verminderter fetaler und postnataler Leydigzellfunktion aufweist, wird bei dem Patienten mit der p.A154T Variante eine penile Hypospadie beschrieben (Tantawy et al., 2014). Als Referenz für die funktionellen

Analysen gilt die p.G35E-Mutante, welche in verschiedensten funktionellen Assays einen deutlichen Funktionsverlust gezeigt hat und der Genotyp als Ursache des Phänotyps einer kompletten Gonadendysgenese angesehen wird (El-Khairi & Achermann, 2012).

Die SF1-Mutation der DBD (p.R62C), welche zu einer partiellen Gonadendysgenese führt, zeigt ebenso wie die Referenz p.G35E einen deutlichen, signifikanten Verlust der Aktivierungsfähigkeit des SOX9 Enhancers TESCO im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 17). Ebenfalls für den CYP11A1-Promoter weist sie eine signifikant erniedrigte Aktivierung im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 17). Für den AMH-Promoter weist sie mit dem pCS2-Leervektor (Abbildung 17) eine reduzierte Aktivierung auf, mit dem pcDNA-Leervektor lediglich in TM4-Zellen (Abbildung 24).

Im Gegensatz dazu weist der Patient mit der p.A154T-Variante ohne apparente Beeinträchtigung der Sertolizellfunktion keine Auffälligkeiten in den funktionellen Assays auf (Abbildung 17). Die Variante p.A154T verhält sich wie eine Wildtyp-Variante. Der Patient weist normale Inhibin B-Werte auf und der Vater, welcher ebenfalls Träger der p.A154T-Mutation ist, wird als fertil beschrieben. Die Position 154 in den vergleichenden Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies ist im Gegensatz zu den anderen untersuchten Positionen dieser Arbeit nicht hochkonserviert (Abbildung 3). In Zusammenschau mit der fehlenden funktionellen Relevanz ist daher von einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, Single Nucleotide Polymorphism) bzw. nach ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) Standards und Leitlinien von einer benignen Variante auszugehen (Richards et al., 2015).

In den meisten Fällen von Hypospadien werden Polymorphismen diverser Kandidatengene (FGF8, FGFR2, AR, HSD17B3, CYP1A1) und Umwelt- sowie maternale Faktoren (insbesondere plazentare Insuffizienz) als ursächlich angenommen (van der Zanden et al., 2012).

4.4. Fragestellung 3: Genotyp-Phänotyp

Die gefundenen neuen Mutationen sollten im Vergleich zu bekannten, bereits beschriebenen heterozygoten Mutationen mit unterschiedlich ausgeprägtem Phänotyp untersucht werden.

Folgende Fragen zu diesen Mutationen bzw. Phänotypen werden promoterspezifisch beantwortet:

- Gibt es signifikante Unterschiede in den Aktivierungsniveaus der relevanten Promotoren in den verschiedenen Kategorien (Schweregrad der Gonadendysgenese)?
- Korrelieren diese signifikanten Unterschiede gegebenenfalls mit den klinischen Phänotypen? Korrelieren die signifikanten Unterschiede quantitativ mit den klinischen Markern der Gonadendysgenese/Sertolizellfunktion (SOX9 Enhancer TESCO) bzw. Leydigzellfunktion (CYP11A1) mit den verschiedenen Kategorien (Schweregrad der Gonadendysgenese)? Haben die Mutationen von Patienten mit schwerer Gonadendysgenese z.B. eine geringere SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung als von Patienten mit partieller oder leichter Gonadendysgenese? Haben die Mutationen von Patienten mit geringer Virilisierung im Sinne einer verminderten Leydigzellfunktion eine niedrigere CYP11A1-Aktivierung als die Mutationen von Patienten mit ausgeprägter/normaler Virilisierung? Ist der AMH-Promotor aussagekräftig in Bezug auf persistierende Müller'sche Strukturen?
- Lassen sich diese Unterschiede in den Aktivierungsniveaus der relevanten Promotoren durch Kotransfektionen mit Kofaktoren in den verschiedenen Kategorien sensitiver messen?
- Sind die Ergebnisse der bereits analysierten Mutanten konstant zu den bisherigen Publikationen?

Als Referenz gilt ebenfalls die p.G35E-Mutante (El-Khairi & Achermann, 2012).

Insgesamt konnte die zugrunde liegende Hypothese bestätigt werden: Die Mutationen der untersuchten leichten und schwer betroffenen Patienten mit XY-DSD unterscheiden sich in einem optimierten in vitro Testsystem im Hinblick auf die funktionelle Einschränkung der veränderten Proteine.

4.4.1. SOX9 Enhancer TESCO

Das in vitro Testsystem mit dem SOX9 Enhancer TESCO zeigt eine Funktionseinschränkung der untersuchten SF1-Mutationen, welche mit dem Phänotyp und labordiagnostischen Markern der Sertolizellfunktion korreliert.

Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Aktivierung des SOX9 Enhancers TESCO.

SF1-Mutationen der DBD (p.G35E, p.R62C) und LBD (p.L376F), welche zu einer partiellen oder kompletten Gonadendysgenese führen, zeigen einen deutlichen Verlust der Aktivierungsfähigkeit des SOX9 Enhancers TESCO (Abbildung 18). Diese verminderte Aktivierungsfähigkeit kann nicht durch Selbstaktivierung von SOX9 oder Kooperationseffekte kompensiert werden (Abbildung 19, Abbildung 20). Die Patienten hatten bei Diagnosestellung ebenfalls klinische (dysgenetische Gonaden) und labordiagnostische Hinweise (erhöhte FSH-, sowie erniedrigte AMH- bzw. Inhibin B-Werte) einer verminderten Sertolizellfunktion als Marker der Gonadendysgenese (Tabelle 2).

Es zeigen sich keine signifikanten Aktivierungsunterschiede zwischen den Mutationen einer partiellen Gonadendysgenese (p.R62C, p.L376F) und der kompletten Gonadendysgenese (p.G35E) (Abbildung 18, Abbildung 19).

Die Patienten mit SF1-Punktmutationen in der HR (p.P131L, p.R191C), mit dem geringer ausgeprägten Phänotyp einer Infertilität, zeigen eine leicht reduzierte Aktivierungsfähigkeit des SOX9 Enhancers TESCO in HEK-Zellen und einen verminderten (p.P131L) und sogar negativen (p.R191C) Interaktionseffekt mit dem Kofaktor SOX9 (Abbildung 18, Abbildung 20). Die Hypothese der Erstbeschreiber dieser Mutationen ist, dass der Zeitpunkt einer apparenten Infertilität im Alter durch eine partielle testikuläre Dysgenese embryonal determiniert sein kann (Anu Bashamboo et al., 2010). Passend dazu weisen beide Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine verminderte Sertolizellfunktion im Sinne eines abnormalen Spermioogrammes auf. Bei p.R191C sind ebenfalls ein vermindertes Inhibin B und Störungen der Leydigzellfunktion beschrieben. Bei dem Patienten mit der niedriger aktivierenden p.R191C-Mutation wurde die Infertilität bereits mit 25 Jahren apparent (p.R191C=40% WTA), während sie bei dem Patienten mit der höher aktivierenden p.P131L-Mutation (p.P131L=80% WTA) mit 41 Jahren apparent wurde (Anu Bashamboo et al., 2010). Die Ergebnisse der verminderten SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung und verminderten SOX9-Interaktion korrelieren mit einer möglichen milden Gonadendysgenese. Zusätzlich legt der negative Interaktionseffekt an der Position R191C Protein-Protein-Interaktionen und eine SOX9-Bindungsdomäne in SF1 nahe.

Wie bereits unter 4.3. diskutiert, verhält sich die p.A154T-Variante in den funktionellen Assays wie der Wildtyp. Klinisch zeigt sich ebenfalls keine Beeinträchtigung der Sertolizellfunktion.

Die Ergebnisse sind konkordant zu bisher veröffentlichten Arbeiten über die Aktivierungseffekte von heterozygoten SF1-Mutationen auf den SOX9 Enhancer TESCO bzw. TES. Mutationen von Patienten mit schweren Gonadendysgenesien zeigen ebenfalls einen deutlichen Aktivierungsverlust, während eine heterozygote SF1-Mutation von einem Patienten mit Mikropenis und dem Verdacht auf eine Sertolizellinsuffizienz einen moderaten Aktivierungsverlust, entsprechend der Patienten in dieser Untersuchung mit Infertilität, zeigt (F Paris, 2011; Knower et al., 2011; Philibert et al., 2011). Ebenfalls bei 7 heterozygoten SF1-Mutationen mit Gonadendysgenese (Histologie nicht bei allen Patienten vorliegend) und variablem Phänotyp wird eine verminderte SOX9 Enhancer TESCO Aktivierung und Interaktion mit SOX9 beschrieben (Robevska et al., 2018). In einer vergleichenden Analyse von 20 SF1-Mutationen (homozygot und heterozygot) mit variablem Phänotyp korrelieren 17 von 20 funktionellen Untersuchungen von SOX9 Enhancer TESCO ebenso wie Synergien von SF1 und SRY sowie SF1 und SOX9 mit dem phänotypischen Schweregrad (Sreenivasan et al., 2018). Allerdings werden auch 2 milde Phänotypen (p.R281P, p.R313C) mit deutlich reduzierter SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung in den funktionellen Assays beschrieben, sowie ein schwer betroffener Phänotyp mit kompletter Gonadendysgenese (p.D8G) und Wildtyp-ähnlicher SOX9 Enhancer TESCO-Aktivierung (Sreenivasan et al., 2018). Von den Autoren wird diskutiert, dass die verminderte SF1-Aktivität der 2 milden Phänotypen ggf. andere SF1-Zielstrukturen nicht betrifft wie z.B. in der Steroidogenese. Für die p.D8G Variante mit schwer betroffenem Phänotyp wird diskutiert, ob es sich gegebenenfalls um einen seltenen Polymorphismus handelt, welcher nicht ursächlich für den Phänotyp sein könnte (Sreenivasan et al., 2018). Dominant negative Effekte dieser Variante sind ebenfalls ausgeschlossen worden (Sreenivasan et al., 2018).

Ebenso wie in vorherigen Publikationen ist für keine der SF1-Mutanten ein dominant-negativer Effekt nachweisbar, welcher dazu führen könnte, dass das Wildtyp-Protein in seiner Aktivität deutlich beeinträchtigt wäre (Lin et al., 2007; N Camats, 2012; Tajima et al., 2009). Der Phänotyp scheint also auf eine Haploinsuffizienz zurückzuführen zu sein. Unklar ist, ob die pathophysiologischen Folgen auf einer gleichen Gewichtung der beiden

SF1-Allele beruht oder individuell ein Allel bevorzugt transkribiert und exprimiert wird. Aufgrund einer unterschiedlichen Penetranz beschriebener Haploinsuffizienzen in Familien ist davon auszugehen, dass viele weitere Einflussfaktoren die Penetranz der SF1-Mutationen bestimmen, welche unter „4.5. Allgemeine Phänotypen-Variabilität“ diskutiert werden.

Für die unzureichende embryonale Ausdifferenzierung der Sertolizellen und damit eines funktionellen Sertolizellpools mit seiner phänotypischen Relevanz kann also der SOX9 Promoter in vitro als Modell fungieren. Ein Aktivitätsverlust in vitro korreliert in dieser Arbeit mit der Gonadendysgenese und diagnostischen Markern der Sertolizellfunktion.

Durch Kotransfektionen von SF1 und SOX9 lassen sich Unterschiede in den Aktivierungsniveaus des SOX9 Enhancers TESCO sensitiver bestimmen. Die Patienten mit SF1-Punktmutationen in der HR (p.P131L, p.R191C) mit dem geringer ausgeprägten Phänotyp einer Infertilität, zeigen einen verminderten (p.P131L) und sogar negativen (p.R191C) Interaktionseffekt mit dem Kofaktor SOX9 (Abbildung 19, Abbildung 20).

In dieser Arbeit ist kein Unterschied für die Mutationen, welche zu einer partiellen und derjenigen, welche zu einer kompletten Gonadendysgenese führen, zu erkennen. Neben weiteren Enhancerregionen von SOX9 mit SF1-Bindungsstellen oder Interaktionen mit anderen Kofaktoren sind andere Promoterkontexte denkbar, welche gegebenenfalls bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Entwicklung entscheidend sind und gewebsspezifisch divergieren.

Als methodische Limitation dieser Arbeit ebenso wie bei anderen Arbeiten ist aufzuführen, dass der murine TESCO-Promoter verwendet wurde, welcher lediglich das Kernelement des SOX9-Promoters darstellt (F Paris, 2011; Philibert et al., 2011). Bei der Verwendung des humanen TES-Promoters ist in einer humanen embryonalen Karzinom-Zelllinie kein Synergieeffekt von humanem SOX9 mit SF1 gezeigt worden, was die potentielle Aussage des hier gezeigten Interaktionsverlustes vermindern könnte (Knower et al., 2011). Da dies jedoch die erste Publikation ist, welche keinen Synergieeffekt beschreibt und in vitro Assays wesentlich durch das Zellmilieu beeinflusst werden, werden weitere Untersuchungen Aufschluss geben.

Entdeckungen über weitere cis-regulatorische Elemente von SOX9 weisen auf komplexe Regulationsmechanismen hin. So konnten eine kritische Region von 32.5 kb (639.6 bis 607.1 kb upstream von SOX9) für XY-Gonadendysgenesien und eine kritische Region von 68-kb (584 bis 516 kb upstream von SOX9) für XX-Gonadendysgenesien identifiziert werden (Kim et al., 2015). Ein Subfragment der kritischen Region für XY-Gonadendysgenesien zeigt bei in vitro Versuchen eine Aktivierbarkeit von SRY. Es ist wahrscheinlich, dass die verschiedenen Enhancer-Regionen für eine testis-spezifische SOX9-Aktivierung kooperieren. Möglich wäre ein Chromatinlooping mit der bekannten TES-Region (Kim et al., 2015). Auch wenn die in vitro Analysen von Promotoren wertvoll sein können, muss beachtet werden, dass kürzere Promoter-Fragmente wie auch TESCO, welche aus ihrem natürlichen, endogenen Promoterkontext gerissen wurden, diesen nicht nachstellen können (Shih et al., 2011). Ein essentielles Ziel für die Zukunft wäre damit, zu verstehen, wie die verschiedenen cis-regulatorischen Elemente interagieren und welche Transkriptionsfaktoren für eine adäquate Expression involviert sind.

4.4.2. CYP11A1

Das in vitro Testsystem mit dem CYP11A1 Promoter zeigt eine Funktionseinschränkung der untersuchten SF1-Mutationen, welche mit der fetalen Leydigzellfunktion korreliert. Für die Testosteronsynthese in den Leydigzellen und genitale Entwicklung spielt CYP11A1 eine wichtige Rolle und erscheint als ein mögliches in vitro Modell der fetalen Leydigzellfunktion.

Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Aktivierung des CYP11A1-Promoters. SF1-Punktmutationen in der DBD (p.G35E, p.R62C) und LBD (p.L376F) führen zu partieller und kompletter Gonadendysgenese und zeigen eine moderate, signifikante Erniedrigung der CYP11A1-Aktivierung in beiden Zelllinien (Abbildung 23). Der Aktivierungsverlust korreliert (insbesondere in den HEK293 Zellen) mit der fetal verminderten Leydigzellfunktion, welche bei den Patienten zu genitaler Ambiguität (p.R62C: „Penile Hypospadie, schwer hypoplastischer Penis, hypoplastisches Skrotum“) oder weiblichem Phänotyp (p.G35E: „phänotypisch weiblich“, p.L376F: „Klitorishypertrophie“) führt (Tabelle 2). Ebenfalls korreliert der Aktivierungsverlust mit laborchemischen Markern der verminderten Leydigzellfunktion (p.G35E und R.62C: Testosteron basal/nach Stimulation nicht messbar bzw. erniedrigt, p.G35E, R.62C und

p.L376F: Testosteron basal normwertig, Gonadotropine nach Stimulation erhöht, vgl. Tabelle 2).

In den HEK293-Zellen weisen die Patienten mit einem weiblichen Phänotyp eine geringere Aktivierung des CYP11A1-Promoters (p.G35E 5% WTA, p.L376F 20% WTA) als der Patient mit männlichem Phänotyp auf (p.R62C 40% WTA), wobei p.G35E mit dem klinischen Bild einer kompletten Gonadendysgenese die niedrigste Aktivierung aufweist (Abbildung 23). Es ist jedoch anzunehmen, dass bei einer kompletten Gonadendysgenese ohne funktionalen Leydigzellpool CYP11A1 keine oder eine sehr untergeordnete Rolle für die genitale Entwicklung spielt. Interessanterweise kann die Mutation p.R62C des Phänotyps mit der ausgeprägtesten Virilisierung in HEK293-Zellen mit steigender Konzentration eine zunehmende Aktivierung des CYP11A1-Promoters erzielen, während p.G35E und p.L376F von Patienten mit weiblichem Phänotyp keinen Anstieg zeigen (Abbildung 16). Als potentielle Ressource könnte dieser Dosiseffekt in vivo eine Rolle spielen, durch den gegebenenfalls ein partieller Funktionsverlust bei Mutanten des Transkriptionsfaktors SF1 durch vermehrte Proteinbiosynthese ausgeglichen werden könnte.

In TM4-Zellen lässt sich kein Unterschied zwischen den Patienten mit partieller und kompletter Gonadendysgenese erkennen, jedoch bei allen eine signifikante Reduktion der Aktivität im Vergleich zum Wildtyp.

Im Gegensatz dazu weist von den untersuchten SF1-Mutationen der HR (p.P131L, p.A154T, p.R191C) von Patienten des mildereren Phänotyps der Infertilität und der Hypospadie lediglich p.R191C in HEK293-Zellen eine gering verminderte CYP11A1-Aktivierung auf (Abbildung 23). Die 3 Mutationen weisen in TM4-Zellen sowie p.P131L und p.A154T ebenfalls in den HEK293-Zellen eine Wildtyp-ähnliche Aktivierung auf. Die Patienten weisen einen männlichen Phänotyp mit embryonal adäquater Leydigzellfunktion und damit Virilisierung auf. Sollte der Aktivierungsverlust der p.R191C-Mutante auch in vivo vorliegen, scheint er durch die fetale Leydigzellpopulation aufgrund des männlichen Phänotyps kompensierbar zu sein. Die Ergebnisse korrelieren nicht mit laborchemischen Markern der Leydigzellfunktion (vgl. Tabelle 2).

In dieser Untersuchung besteht eine Korrelation der in vitro Ergebnisse mit den Markern der fetalen Leydigzellpopulation der Patienten und nur wenig bis keine Korrelation mit den labordiagnostischen Markern der Leydigzellfunktion. Die fetale Leydigzellpopulation scheint durch SF1-Mutationen stärker affiziert zu sein als die adulte

Leydigzellpopulation, da auch bei partiellen Gonadendysgenesien mit embryonaler Untervirilisierung normale Testosteronwerte gemessen werden können (Tabelle 2, p.L376F). Alle Patienten mit partieller und kompletter Gonadendysgenese zeigen jedoch eine Beeinträchtigung der fetalen Leydigzellfunktion, was in einer Ambiguität der Genitale resultiert. Bei einer leichten Affektion der Sertolizellen wie bei den Patienten mit Infertilität ist die embryonale Virilisierung jedoch nicht beeinträchtigt.

Eine eingeschränkte SF1-Funktion bei partiellen Gonadendysgenesien scheint für die Steroidproduktion der adulten Leydigzellpopulation kompensierbar zu sein (Tantawy et al., 2012).

Die Vergleichbarkeit von CYP11A1 Luciferase-Assays mit verschiedenen Protokollen ist insgesamt als gering einzustufen (Köhler et al., 2008; Lin et al., 2007). Die erstbeschriebene p.G35E Mutante zeigt in den HEK293-Zellen eine ähnliche Aktivierung von ca. 10% WTA wie bereits für eine andere humane embryonale Nierenzelllinie beschrieben (Ito et al., 2000).

Für die p.L376F Mutante ist eine 40%ige WTA in humanen embryonalen tsa201 Nierenzellen gezeigt worden, welche ähnlich der geringen Aktivierung in den hier verwendeten HEK293-Zellen ist (Tantawy et al., 2012). Dies ist ein ebenso ähnlich geringes Aktivierungsniveau wie die Referenz p.G35E (Tantawy et al., 2012). Dahingegen zeigen die Mutanten p.P131L und p.R191C in vorherigen Untersuchungen 30-40% WTA in HEK-Zellen (Anu Bashamboo et al., 2010) und liegen damit über der Referenz p.G35E, welche ca. 15% WTA aufwies. In der hier vorliegenden Untersuchung zeigt p.P131L eine nicht signifikante Reduktion der Aktivierung um 80% WTA, p.R191C um 60% (Abbildung 23). So ergeben unterschiedliche Versuchsbedingungen zwar unterschiedliche Aktivierungsniveaus, das Verhältnis zu der Referenz p.G35E mit kompletter Gonadendysgenese bleibt jedoch vergleichbar und gestattet eine grobe Korrelation zum Phänotyp der Patienten mit kompletter und partieller Gonadendysgenese als Marker der fetalen Leydigzellfunktion.

Der verwendete minimale CYP11A1-Promoter erscheint aufgrund einer essentiellen Funktion für die Transkription des SF1-Targetgens CYP11A1 und damit der Steroidproduktion als grobes Untersuchungsmodell der fetalen Leydigzellfunktion möglich. Bei der Ergebnisinterpretation sollten die verschiedenen Zelllinien und Protokolle berücksichtigt werden. Ein Rückschluss auf die Differenzierung der

Leydigzellpopulation als determinierender Faktor der Androgenproduktion ist nicht möglich.

SF1 gilt als der grundlegende Differenzierungsfaktor der gonadalen und adrenalen steroidogenetischen Gewebe. In der Stammzellforschung konnten bereits mesenchymale Stammzellen durch SF1 in steroidogenetische Zellen differenziert werden (Yazawa et al., 2014). Sie produzieren autonom neben Androgenen diverse Steroidhormone wie Östrogene, Progesteron, Glukokortikoide und Aldosteron (Yazawa et al., 2014). Um diese Erkenntnisse diagnostisch und therapeutisch nutzen zu können, ist es essentiell, die Konditionen zu erforschen, welche die steroidogenetische Zelllinie in adrenale oder gonadale, und damit auch Leydigzellen, differenzieren lassen (Yazawa et al., 2014). Die Identifikation weiterer Proliferations- und Differenzierungsfaktoren könnten dann auch *in vitro* genauere Aufschlüsse über die fetale und adulte Leydigzellfunktion und –differenzierung geben.

Es ist bereits gezeigt worden, dass SF1 in fetalen Leydigzellen die Differenzierung beeinflusst, während es in adulten Leydigzellen die Progenitorformation und/oder –überleben reguliert (Karpova et al., 2015). Neben SF1 ist das Signalmolekül DHH ein wichtiges Kandidatengen für die Leydigzellentwicklung, da die SF1-Expression in den Leydigzellen abhängig von DHH aus Sertolizellen heraufreguliert wird (Barsoum & Yao, 2010; Park et al., 2007). Ebenfalls beeinflusst eine Alteration der Androgene die adulte Leydigzellpopulation (Kilcoyne et al., 2014). SF1-Mutationen könnten sich also primär über eine gestörte Differenzierung steroidogener Gewebe und sekundär über eine Sertolizellaffektion und veränderte parakrine DHH-Stimulation oder über eine Alteration der Androgensynthese auf die fetale und adulte Leydigzellfunktion auswirken (Barsoum & Yao, 2010; Kilcoyne et al., 2014; Scott, 2007).

4.4.3. AMH

Das *in vitro* Testsystem mit dem AMH Promoter zeigt eine geringe Funktionseinschränkung der untersuchten SF1-Mutationen mit schwer betroffenem Phänotyp. Die AMH-Aktivierung durch SF1-WT und SF1-Mutanten ist ein mögliches aber wenig valides *in vitro* Modell der embryonalen Sertolizellfunktion.

Aufgrund der hohen Leervektoraktivierung bei adäquater Leervektorkontrolle (pcDNA3-Leervektor, Abbildung 24) sind die Aktivierungseffekte des AMH-Promoters durch SF1-WT und SF1-Mutanten als sehr gering anzusehen und mit Vorsicht zu interpretieren. Mit der pCS2-Leervektorkontrolle zeigen sich deutlichere Aktivierungsunterschiede (Abbildung 17). Einzig der Patient mit einer kompletten Gonadendysgenese und persistierenden Müller'schen Strukturen als klinischer Marker der fetal eingeschränkten Sertolizellfunktion bei einer SF1 Mutation in der DBD (p.G35E) zeigt eine geringe, signifikante Erniedrigung der AMH-Promoter-Aktivierung in beiden Zelllinien (Abbildung 24). Die Mutationen p.R62C und p.L376F mit dem Phänotyp der partiellen Gonadendysgenese zeigen in TM4-Zellen eine geringe, signifikante Erniedrigung der AMH-Promoter-Aktivierung (Abbildung 24)

Für die p.G35E Mutante wurde bereits gezeigt, dass sie keine Synergieeffekte mit GATA4 im Gegensatz zum Wildtyp hat (Tremblay & Viger, 2003), die Mutanten mit partieller Gonadendysgenese (p.R62C, p.L376F) zeigen ebenfalls eingeschränkte Synergieeffekte mit GATA4 im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 25).

Bereits in anderen Untersuchungen ist eine große Variabilität der Aktivierbarkeit des AMH-Promoters in Abhängigkeit von den verwendeten Protokollen und des verwendeten Konstruktes aufgefallen (Anu Bashamboo et al., 2010; Tremblay & Viger, 2003). Die Aktivierungsfähigkeit des bei Tremblay & Viger verwendeten minimalen AMH-Promoters (-65 bis +53) durch den Wildtyp in CV1-Zellen entspricht der geringen Aktivierung durch SF1-WT und SF1-Mutanten dieser Arbeit (Tremblay & Viger, 2003). Bei dem -269 AMH-Promoter zeigt sich eine Leervektoraktivierung von <5% WTA und eine Aktivierung von p.G35E um 10%, bei p.P131L und p.R191C liegt sie um 40% (Anu Bashamboo et al., 2010). Das von Bashamboo et al. verwendete AMH-Promoterkonstrukt (-269bp) scheint stärkere Aktivierungsunterschiede zu messen als das in dieser Arbeit verwendete -360 bp Konstrukt. Zusätzlich sind unterschiedliche Versuchsbedingungen (Zellmilieu, Leervektorkontrolle) zu berücksichtigen.

In einigen Publikationen ist angenommen worden, dass die Regression der Müller'schen Strukturen auf eine erniedrigte AMH-Promoteraktivierung durch SF1-Mutanten zurückzuführen sei (Eggers et al., 2014; Lin et al., 2007). Jedoch sind ebenfalls bereits Diskrepanzen zwischen funktionellem Aktivierungsverlust in vitro ohne Persistenz der

Müllersch'sen Strukturen in vivo beschrieben worden (Köhler et al., 2008; Philibert et al., 2011).

Unabhängige in vivo Experimente in der Maus zeigen, dass nicht SF1 sondern SOX9 verantwortlich für die ausreichende AMH-Expression oder Persistenz der Müller'schen Strukturen ist (Arango et al., 1999; Jeyasuria et al., 2004). Arango et al. mutierten die spezifischen SF1- und SOX9-Bindungsstellen des murinen AMH-Promoters. Homozygote männliche Mäuse mit mutierter SF1-Bindungsstelle produzieren auf reduziertem Niveau AMH, welches jedoch ausreichend war, um die Regression der Müller'schen Gänge zu veranlassen. Im Gegensatz dazu können homozygote männliche Träger einer mutierten SOX9-Bindungsstelle die AMH-Expression nicht induzieren und die Müller'schen Strukturen entwickelten sich (Arango et al., 1999). Ebenso führt der gonadenspezifische SF1-knockout bei Mäusen zu einer immunhistochemischen normalen AMH-Expression im Vergleich zum Wildtyp und einer Regression der Müller'schen Gänge (Jeyasuria et al., 2004). Da SOX9 der Initiator der AMH-Regulation ist, scheint SF1 ein quantitativer Regulator der AMH-Transkriptionslevel zu sein, welcher möglicherweise andere Strukturen als die Müller'schen Gänge beeinflusst (Arango et al., 1999).

4.5. Allgemeine Phänotypen-Variabilität

Auch wenn die funktionellen Beeinträchtigungen der in vitro untersuchten Mutanten mit den Phänotypen teilweise korrelieren, ist keine klare Assoziation mit den beobachteten Phänotypen möglich (Domenice et al., 2016).

Im Gegensatz zu SRY-Mutationen, welche fast immer zu kompletten Gonadendysgenesien führen, führen SF1-Mutationen fast immer zu partiellen Gonadendysgenesien mit großer Variabilität (Ostrer, 2008). Die Penetranz von Keimzell-SRY-Deletionen gilt als 100%, die Penetranz von SF1 als unklar (Ostrer, 2008).

Eine familiäre Heterogenität des Phänotyps bei gleichen SF1-Mutationen wird in verschiedenen Publikationen beschrieben. Bei der heterozygoten Frameshift-Mutation c.536delC zeigen die beiden XY-Kinder einer fertilen, ebenfalls betroffenen Mutter Gonadendysgenesien mit Unterschieden in der phänotypischen Ausprägung. Die Ambiguität der externen Genitale wird als unterschiedlich ausgeprägt angegeben,

ebenso die labordiagnostischen Marker der Leydig- und Sertolizellfunktion und Histologie der Gonaden (Coutant et al., 2007). Philibert et al. beschreiben ebenfalls eine inkomplette Penetranz: Eine Mutter mit einer p.V355M Variation gebar dizygote männliche Zwillinge von denen einer eine bilaterale Anorchie aufweist, der andere zeigt eine normale testikuläre Entwicklung (Philibert et al., 2007). Eine breite Variabilität der phänotypischen Ausprägung bei heterozygoten SF1-Mutationen ist ebenfalls in zwei weiteren Familien mit maternaler Vererbung dargestellt (Warman et al., 2011). Diese reichen von schwerer pränataler Untervirilisierung bis zu normaler pubertärer Entwicklung in betroffenen 46,XY-Geschwistern. Ebenfalls wird eine ovarielle Dysgenese im Kontrast zu fertilen 46,XX-Familienmitgliedern angegeben (Warman et al., 2011).

Auch wird eine heterozygote SF1-Mutation (c.842G>C) mit paternaler Vererbung beschrieben: Bei dem fertilen und phänotypisch unauffälligen Vater liegt diese als Mosaik vor, der Sohn zeigt eine partielle Gonadendysgenese (Philibert et al., 2011). Bei ebenfalls paternaler Vererbung wird bei einer heterozygoten Punktmutation (c.938G>A) über 3 Generationen ein phänotypisches Spektrum von mild (Hypospadien, Fertilität) bis schwer (Gonadendysgenesien) bei XY-Individuen und prämaturner Ovarialinsuffizienz oder unauffälligem Phänotyp bei XX-Individuen angegeben (Ciaccio et al., 2012). Ebenfalls wird von einer paternalen Vererbung einer SF1-Mutation bei XX-DSD und klinisch unauffälligem Vater berichtet (Swartz et al., 2017), sowie bei XY-Individuen mit schwerer Hypospadie und fertilem Vater (Yagi et al., 2015).

Daher werden multiple modulierende Faktoren, welche die SF1-Proteinaktivität als Korepressoren und Stimulatoren selbst in einer Familie beeinflussen, vermutet.

Es wäre denkbar, dass SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) oder genetische Variationen in anderen unabhängigen Transkriptionsfaktoren oder modifizierenden genetischen Faktoren (oligogenetische Vererbung) die Penetranz beeinflussen könnten (Ciaccio et al., 2012). So konnte beispielsweise bei einem Patienten, mit dem bei heterozygoten SF1-Mutationen seltenen Phänotyp der kompletten Gonadendysgenese, eine heterozygote SF1-Mutation und eine Mutation der *MAP3-Kinase* nachgewiesen werden (Mazen et al., 2016). Da die *MAP3-Kinase* eine wichtige Rolle für die SRY-Aktivierung spielt (Larney et al., 2014), erscheint eine Kombination von Mutationen zweier Targetgene plausibel für den schweren Phänotyp einer kompletten Gonadendysgenese. Ebenfalls wird bei zwei Patienten mit Gonadendysgenese und heterozygoter SF1-

Mutation (p.R84H) bei dem schwerer betroffenen Phänotyp eine heterozygote Variante von FOG2 (p.M703L) beschrieben. Heterozygote FOG2-Mutationen sind mit kongenitalen Herzdefekten beschrieben (Pizzuti et al., 2003), ebenfalls werden Mutationen bei Patienten mit partieller und kompletter Gonadendysgenese FOG2-Mutationen gezeigt (Anu Bashamboo et al., 2014).

Eine Geninteraktion im Sinne einer Epistase würde dann vorliegen, wenn ein Gen die phänotypische Ausprägung eines anderen Gens beeinflussen oder sogar komplett unterdrücken kann (Moore & Williams, 2009). Vergleichende Exomsequenzierungen in genomweiten Assoziationsstudien, gerade auch von Familien mit mehreren betroffenen Personen, könnten in Zukunft über Targetgene Aufschluss geben, welche protektive Eigenschaften besitzen oder die Ausprägung begünstigen (Moore & Williams, 2009). Die Zusammenschau der krankheitsassoziierten Gene, ihre Variation in der Gesellschaft und ihr funktionell spezifischer Effekt auf den Phänotyp wird in Zukunft unser Verständnis der genetischen Netzwerke verbessern und die Vorhersage der individuellen Suszeptibilität bei genetischen Variationen ermöglichen (Moore & Williams, 2009).

Desweiteren können die Epigenetik und die Beeinflussung durch Umweltfaktoren in Zukunft weitere Einblicke ermöglichen (Multifaktoriell-polygenetische Vererbung).

Ogleich bereits einige epigenetische Aspekte im Zusammenhang mit der Geschlechtsentwicklung untersucht wurden, stützen sich die derzeitigen Hypothesen über physiologische und pathologische Geschlechtsentwicklung vor allem auf Transkriptionsfaktoren (Larney et al., 2014).

In vivo Experimente in Ratten zur Untersuchung der epigenetischen Modifikation der SF1-Transkription bei pränatalem Nikotinkonsum konnten schädigende Veränderungen der Nebennieren, eine verminderte Transkription von SF1 sowie seinen Targetgenen durch Histondeacetylierung nachweisen (Yan et al., 2014). Auch ist die Interaktion von SF1 mit StAR (steroidogenic acute regulatory protein) bei Nikotingabe reprimiert (Yan et al., 2014). Ebenfalls in vivo konnte gezeigt werden, dass Koffein zu verminderten Protein- und mRNA-Expressionen von SF1-Targetgenen wie StAR und CYP11A1 bei aberranter DNA-Methylierung und Histonacetylierung des SF1-Promoters in der fetalen Nebenniere führt (Ping et al., 2014). Diese Effekte könnten zu einer verminderten SF1-Expression und der assoziierten steroidogenetischen Enzyme während der fetalen Entwicklung führen (Ping et al., 2014). Neben der Regulation der Genaktivität als Antwort auf Umweltfaktoren, spielt die Epigenetik für die Genexpression während der Entwicklung

und Differenzierung eine wichtige Rolle (Jones & Baylin, 2007). Epigenetische Modifikationen können somit ein wichtiges weiteres Glied für die Genotyp-Phänotyp-Korrelation darstellen (Jaenisch & Bird, 2003).

4.6. Zusammenfassung

In dieser Dissertation erfolgt eine vergleichende funktionelle Charakterisierung von verschiedenen heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung, welche bisher nicht in dieser Konstellation untersucht wurden. Dies erfolgt unter der Fragestellung einer möglichen Korrelation von Genotyp und Phänotyp der leichten und schwerer betroffenen Patienten durch ein optimiertes funktionelles Testsystem.

Es können zwei neue SF1-Varianten (p.R62C, p.A154T) beschrieben werden, wobei es sich bei p.R62C um eine Mutation und bei p.A154T in Zusammenschau des Phänotyps, der Konservierung und der funktionellen Untersuchungen um einen Einzelnukleotid-Polymorphismus handelt.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Genotyp-Phänotyp-Korrelation vergleichend für die untersuchten heterozygoten SF1-Punktmutationen aus verschiedenen funktionellen Bereichen durch den SOX9 Enhancer TESCO und Interaktionseffekte mit SOX9 dargelegt. Die Analysen des SOX9 Enhancer TESCO korrelieren mit dem Grad der Gonadendysgenese. Die schwer betroffenen Phänotypen (komplette und partielle Gonadendysgenese) zeigen eine deutlich verminderte SOX9-Enhancer Aktivierung sowie eingeschränkte Synergie mit SOX9. Die leicht betroffenen Phänotypen (Infertilität) zeigen lediglich einen reduzierten Interaktionseffekt mit SOX9. Der SOX9 Enhancer TESCO kann in vitro als Modell der Testisdeterminierung fungieren, entsprechend der Ausdifferenzierung eines funktionellen Sertolizellpools mit dessen phänotypischer Relevanz.

Dabei sind die Aktivierungsverluste der schwer betroffenen Phänotypen für den SOX9 Enhancer TESCO wesentlich ausgeprägter als für den AMH-Promoter. Die AMH-Aktivierung durch SF1-WT und SF1-Mutanten ist ein mögliches aber wenig valides in vitro Modell der embryonalen Sertolizellfunktion.

Ebenfalls zeigen Mutationen, welche zu einer partiellen oder kompletten Gonadendysgenese führen, eine Reduktion der CYP11A1-Aktivierung. Der verwendete minimale CYP11A1-Promoter erscheint aufgrund einer essentiellen Funktion für die Transkription des SF1-Targetgens CYP11A1 und damit der Steroidproduktion als grober Marker der fetalen Leydigzellfunktion möglich. Ein Rückschluss auf die Differenzierung der Leydigzellpopulation als determinierender Faktor der Androgenproduktion ist jedoch nicht möglich.

Zusammenfassend kann die Arbeitshypothese, dass sich die Mutationen der leichten und schwerer betroffenen Patienten mit 46,XY-DSD in dem gewählten in vitro Testsystem unterscheiden, bestätigt werden. Eine Korrelation zwischen Phänotyp und Genotyp ist für die untersuchten Mutationen prinzipiell möglich. Eine Vorhersagemöglichkeit des klinischen Phänotyps aufgrund einer Korrelation mit dem SF1-Genotyp durch die funktionelle Charakterisierung in vitro ist jedoch derzeit nicht möglich. Im Vergleich zu anderen in vitro Testsystemen liefert das gewählte Testsystem keine sensitivere Aussage.

5. Literaturverzeichnis

- Achermann, J. C., Domenice, S., Bachega, T. A. S. S., Nishi, M. Y., & Mendonca, B. B. (2015). Disorders of sex development: effect of molecular diagnostics. *Nature Reviews Endocrinology*, *11*(8), 478–488.
- Achermann, J. C., Ito, M., Ito, M., Hindmarsh, P. C., & Jameson, J. L. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nature Genetics*, *22*(2), 125–126.
- Achermann, J. C., Ozisik, G., Ito, M., Orun, U. A., Harmanci, K., Gurakan, B., & Jameson, J. L. (2002). Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87*(4), 1829–1833.
- Aksglaede, L., Sørensen, K., Boas, M., Mouritsen, A., Hagen, C. P., Jensen, R. B., Petersen, J. H., Linneberg, A., Andersson, A.-M., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2010). Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *95*(12), 5357–5364.
- 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. (2011). Mutation analysis of NR5A1 encoding steroidogenic factor 1 in 77 patients with 46, XY disorders of sex development (DSD) including hypospadias. *PLoS One*, *6*(10), e24117.
- Andersson, A.-M. (2000). Inhibin B in the assessment of seminiferous tubular function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, *14*(3), 389–397.
- Applied Biosystems 3130 and 3130xl Genetic Analyzers. (2010). *System Profile, Applied Biosystems*.
Abgerufen am 15.09.2015, von:
https://www.labmakelaar.com/fjc_documents/geneticanalizer3130xl.pdf
- Arango, N. A., Lovell-Badge, R., & Behringer, R. R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, *99*(4), 409–419.

- Arboleda, V., Lee, H., Sánchez, F., Délot, E., Sandberg, D., Grody, W., Nelson, S., & Vilain, E. (2013). Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. *Clinical Genetics*, *83*(1), 35–43.
- Audi, L., Ahmed, S. F., Krone, N., Cools, M., McElreavey, K., Holterhus, P. M., Greenfield, A., Bashamboo, A., Hiort, O., Wudy, S. A., McGowan, R. (2018). Genetics in endocrinology: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 “DSDnet.” *European Journal of Endocrinology*, *179*(4), R197–R206.
- Babu, P. S., Bavers, D. L., Shah, S., & Hammer, G. D. (2000). Role of phosphorylation, gene dosage and Dax-1 in SF-1 mediated steroidogenesis. *Endocrine Research*, *26*(4), 985–994.
- Barbaro, M., Cools, M., Looijenga, L. H. J., Drop, S. L. S., & Wedell, A. (2011). Partial deletion of the NR5A1 (SF1) gene detected by synthetic probe MLPA in a patient with XY gonadal disorder of sex development. *Sexual Development*, *5*(4), 181–187.
- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kist, R., Taketo, M. M., Englert, C., & Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of Reproduction*, *74*(1), 195–201.
- Barsoum, I. B., & Yao, H. H.-C. (2010). Fetal Leydig Cells: Progenitor Cell Maintenance and Differentiation. *Journal of Andrology*, *31*(1), 11–15.
- Bashamboo, A., Brauner, R., Bignon-Topalovic, J., Lortat-Jacob, S., Karageorgou, V., Lourenco, D., Guffanti, A., & McElreavey, K. (2014). Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Human Molecular Genetics*, *23*(14), 3657–3665.
- 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., Udn, M. of, Eozenou, C., Suntharalingham, J. P., de Silva, K. S. H., Lin, L., Bignon-Topalovic, J., Poulat, F., Lagos, C.F., McElreavey, K., & Achermann, J. C. (2016). A recurrent p.Arg92Trp variant in steroidogenic factor-1 (NR5A1) can act as a molecular switch in human sex development. *Human Molecular Genetics*, *25*(16), 3446–3453.
- 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., & McElreavey, K. (2010). Human male infertility associated

- with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. *The American Journal of Human Genetics*, 87(4), 510.
- Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2010). NR5A1/SF-1 and development and function of the ovary. *Annales d'Endocrinologie*, 71(3), 177–182.
- Beau, C., Vivian, N., Münsterberg, A., Dresser, D. W., Lovell-Badge, R., & Guerrier, D. (2001). In vivo analysis of the regulation of the anti-Müllerian hormone, as a marker of Sertoli cell differentiation during testicular development, reveals a multi-step process. *Molecular Reproduction and Development*, 59(3), 256–264.
- Bernard, P., Ryan, J., Sim, H., Czech, D. P., Sinclair, A. H., Koopman, P., & Harley, V. R. (2012). Wnt signaling in ovarian development inhibits Sf1 activation of Sox9 via the Tesco enhancer. *Endocrinology*, 153(2), 901–912.
- Biason-Lauber, A., & Schoenle, E. J. (2000). Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1563–1568.
- Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., Grinberg, A., Huang, S., Kreidberg, J. A., Parker, K. L., Porter, F. D., & Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909–913.
- Bishop, C. E., Whitworth, D. J., Qin, Y., Agoulnik, A. I., Agoulnik, I. U., Harrison, W. R., Behringer, R. R., & Overbeek, P. A. (2000). A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nature Genetics*, 26(4), 490–494.
- Bland, M. L., Jamieson, C. A., Akana, S. F., Bornstein, S. R., Eisenhofer, G., Dallman, M. F., & Ingraham, H. A. (2000). Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(26), 14488–14493.
- Boom, R., Sol, C. J., Salimans, M. M., Jansen, C. L., Wertheim-van Dillen, P. M., & van der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(3), 495–503.
- Borst, P. (2005). Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life*, 57(11), 745–747.

- Bouma, G. J., Hart, G. T., Washburn, L. L., Recknagel, A. K., & Eicher, E. M. (2004). Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expression Patterns*, 5(1), 141–149.
- Brennan, J., & Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 509–521.
- Calvo, R. M., Asunción, M., Tellería, D., Sancho, J., San Millán, J. L., & Escobar-Morreale, H. F. (2001). Screening for mutations in the steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic factor-1 genes, and in CYP11A and dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia gene on the X chromosome, gene-1 (DAX-1), in hyperandrogenic hirsute women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(4), 1746–1749.
- 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. (2012). 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. *Hormone Research in Paediatrics*, 78(2), 119–126.
- Cline, J., Braman, J. C., & Hogrefe, H. H. (1996). PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, 24(18), 3546–3551.
- Correa, R. V., Domenice, S., Bingham, N. C., Billerbeck, A. E. C., Rainey, W. E., Parker, K. L., & Mendonca, B. B. (2004). A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(4), 1767–1772.
- Cotnoir-White, D., Laperrière, D., & Mader, S. (2011). Evolution of the repertoire of nuclear receptor binding sites in genomes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 334(1), 76–82.
- Coutant, R., Mallet, D., Lahlou, N., Bouhours-Nouet, N., Guichet, A., Coupris, L., Croué, A., & Morel, Y. (2007). Heterozygous Mutation of Steroidogenic Factor-1 in 46,XY Subjects May Mimic Partial Androgen Insensitivity Syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(8), 2868–2873.
- Cox, K., Bryce, J., Jiang, J., Rodie, M., Sinnott, R., Alkhawari, M., Arlt, W., Audi, L., Balsamo, A., Bertelloni, S., Cools, M., Darendeliler, F., Drop, S., Ellaithi, M., Guran, T., Hiort, O., Holterhus, P.-

- M., Hughes, I., Krone, N., Lisa, L., Morel, Y., Soder, O., Wieacker, P., & Ahmed, S. F. (2014). Novel Associations in Disorders of Sex Development: Findings From the I-DSD Registry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *99*(2), E348–E355.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., & Berta, P. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(11), 6653–6665.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, *45*, 2565.
- Domenice, S., Machado, A. Z., Ferreira, F. M., Ferraz-de-Souza, B., Lerario, A. M., Lin, L., Nishi, M. Y., Gomes, N. L., da Silva, T. E., Silva, R. B., Correa, R. V., Montenegro, L. R., Narciso, A., Costa, E. M. F., Achermann, J. C., & Mendonca, B. B. (2016). Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals. *Birth Defects Research*, *108*(4), 309–320.
- Eggers, S., Smith, K. R., Bahlo, M., Looijenga, L. H., Drop, S. L., Juniarto, Z. A., Harley, V. R., Koopman, P., Faradz, S. M., & Sinclair, A. H. (2014). Whole exome sequencing combined with linkage analysis identifies a novel 3 bp deletion in NR5A1. *European Journal of Human Genetics*, *23*(4):486-493.
- El-Khairi, R., & Achermann, J. C. (2012). Steroidogenic factor-1 and human disease. *Seminars in Reproductive Medicine*, *30*, 374–381.
- Fabrizi, H. C., Ribeiro de Andrade, J. G., Maciel-Guerra, A. T., Guerra-Júnior, G., & de Mello, M. P. (2016). NR5A1 Loss-of-Function Mutations Lead to 46,XY Partial Gonadal Dysgenesis Phenotype: Report of Three Novel Mutations. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, *10*(4), 191–199.
- Ferraz-de-Souza, B., Lin, L., & Achermann, J. C. (2011). Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *336*(1), 198–205.
- Foster, J. W., Dominguez-Steglich, M. A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P. A., Stevanović, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I. D., Goodfellow, P. N., Brook, J. D., & Schafer, A. J. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, *372*(6506), 525–530.

- Paris, F., De Ferran, K., Bhangoo, A., Ten, S., Lahlou, N., Audran, F., Servant, N., Poulat, F., Philibert, P., & Sultan, C. (2011). Isolated `idiopathic` micropenis: Hidden genetic defects? *International Journal of Andrology*, *34*(6 Pt 2), e518–e525.
- Garg, V., Kathiriya, I. S., Barnes, R., Schluterman, M. K., King, I. N., Butler, C. A., Rothrock, C. R., Eapen, R. S., Hirayama-Yamada, K., Joo, K., Matsuoka, R., Cohen, J. C., & Srivastava, D. (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*, *424*(6947), 443–447.
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L., & Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Molecular Cell*, *3*(4), 521–526.
- 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. (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mechanisms of Development*, *87*(1), 175–180.
- Hasegawa, T., Fukami, M., Sato, N., Katsumata, N., Sasaki, G., Fukutani, K., Morohashi, K.-I., & Ogata, T. (2004). Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *89*(12), 5930–5935.
- Henderson, A. R. (2006). Testing experimental data for univariate normality. *Clinica Chimica Acta*, *366*(1-2), 112-129.
- Hoivik, E. A., Lewis, A. E., Aumo, L., & Bakke, M. (2010). Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, *315*(1-2), 27–39.
- Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A. N., & Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American Journal of Medical Genetics*, *87*(4), 349–353.
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., Lee, P. A., & Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES)/ European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Consensus Group: Achermann, J., Ahmed, F., Baskin, L., Berenbaum, S., Bertelloni, S., Brock, J., Carmichael, P., Chase, C., Cohen-Kettenis, P., Conte, F., Donohoue, P., Driver, C., Drop, S., Eugster, E., Fujieda, K., Giedd, J., Green, R., Grumbach, M., Harley, V., Hines, M., Hiort, O., Hughes, I., Lee, P., Looijenga, L., McCullough, L., Mendoca, B., Meyer-Bahlburg, H., Migeon, C., Morel, Y.,

- Mouriquand, P., Nordenström, A., Ransley, P., Rapaport, R., Reiner, W., Richter-Appelt, H., Rink, R., Rissman, E., Saenger, P., Sandberg, D., Schober, J., Spack, N., Thomas, B., Thyen, U., Vilain, E., Warne, G., Wisniewski, A., Wilson, J., Woodhouse, C., Zucker, K. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Journal of Pediatric Urology*, 2(3), 148–162.
- Hu, M.-C., Hsu, N.-C., Pai, C.-I., Wang, C.-K. L., & Chung, B. (2001). Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. *Molecular Endocrinology*, 15(5), 812–818.
- Hussain, S., Amar, A., Najeeb, M. N., & Khaliq, S. (2016). Two novel mutations in the NR5A1 gene as a cause of disorders of sex development in a Pakistani cohort of 46,XY patients. *Andrologia*, 48(5), 509–517.
- Ikeda, Y., Lala, D. S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M. P., & Parker, K. L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 7(7), 852–860.
- Ikeda, Y., Shen, W. H., Ingraham, H. A., & Parker, K. L. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 8(5), 654–662.
- Ito, M., Achermann, J. C., & Jameson, J. L. (2000). A naturally occurring steroidogenic factor-1 mutation exhibits differential binding and activation of target genes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31708–31714.
- Ito, M., Yu, R., & Jameson, J. L. (1997). DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1476–1483.
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33, 245–254.
- Jakob, S., & Lovell-Badge, R. (2011). Sex determination and the control of Sox9 expression in mammals. *FEBS Journal*, 278(7), 1002–1009.
- Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S. P., Zhao, L., De Rooij, D. G., Themmen, A. P. N., Behringer, R. R., & Parker, K. L. (2004). Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(7), 1610–1619.

- Johnson, P. H., Miller, M. J., & Grossman, L. I. (1980). Electrophoresis of DNA in agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 102(1), 159–162.
- Jones, A. M., Reed, R. H., Weyers, J., & Weyers, J. D. B. (2007). *Practical Skills in Biology*. Pearson Education.
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The Epigenomics of Cancer. *Cell*, 128(4), 683–692.
- Kalfa, N., Philibert, P., & Sultan, C. (2009). Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *International Journal of Andrology*, 32(3), 187–197.
- Karpova, T., Ravichandiran, K., Insisienmay, L., Rice, D., Agbor, V., & Heckert, L. L. (2015). Steroidogenic Factor 1 Differentially Regulates Fetal and Adult Leydig Cell Development in Male Mice. *Biology of Reproduction*, biolreprod.115.131193.
- Kilcoyne, K. R., Smith, L. B., Atanassova, N., Macpherson, S., McKinnell, C., Driesche, S. van den, Jobling, M. S., Chambers, T. J. G., Gendt, K. D., Verhoeven, G., O'Hara, L., Platts, S., Franca, L. R. de, Lara, N. L. M., Anderson, R. A., & Sharpe, R. M. (2014). Fetal programming of adult Leydig cell function by androgenic effects on stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(18), E1924–E1932.
- Kim, G.-J., Sock, E., Buchberger, A., Just, W., Denzer, F., Hoepffner, W., German, J., Cole, T., Mann, J., Seguin, J. H., Zipf, W., Costigan, C., Schmiady, H., Rostásy, M., Kramer, M., Kaltenbach, S., Rösler, B., Georg, I., Troppmann, E., Teichmann, A. C., Salfelder, A., Widholz, S. A., Wieacker, P., Hiort, O., Camerino, G., Radi, O., Wegner, M., Arnold, H. H., & Scherer, G. (2015). Copy number variation of two separate regulatory regions upstream of SOX9 causes isolated 46,XY or 46,XX disorder of sex development. *Journal of Medical Genetics*, 52(4), 240–247.
- Knower, K. C., Kelly, S., Ludbrook, L. M., Bagheri-Fam, S., Sim, H., Bernard, P., Sekido, R., Lovell-Badge, R., & Harley, V. R. (2011). Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS One*, 6(3), e17751.
- Kobayashi, A., Chang, H., Chaboissier, M.-C., Schedl, A., & Behringer, R. R. (2005). Sox9 in testis determination. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1061, 9–17.
- Köhler, B., Lin, L., Ferraz-de-Souza, B., Wieacker, P., Heidemann, P., Schröder, V., Biebermann, H., Schnabel, D., Grüters, A., & Achermann, J. C. (2008). Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Human Mutation*, 29(1), 59–64.

- Köhler, B., Lin, L., Mazen, I., Cetindag, C., Biebermann, H., Akkurt, I., Rossi, R., Hiort, O., Grüters, & A., Achermann, J. C. (2009). 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. *European Journal of Endocrinology*, *161*(2), 237–242.
- Komatsu, T., Mizusaki, H., Mukai, T., Ogawa, H., Baba, D., Shirakawa, M., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Yamamoto, H., Kikuchi, A., & Morohashi, K. (2004). Small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1) modification of the synergy control motif of Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1 (Ad4BP/SF-1) regulates synergistic transcription between Ad4BP/SF-1 and Sox9. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *18*(10), 2451–2462.
- Kraft, K. H., Shukla, A. R., & Canning, D. A. (2011). Proximal Hypospadias. *The Scientific World Journal*, *11*, 894–906.
- Krege, S., Eckoldt, F., Richter-Unruh, A., Köhler, B., Leuschner, I., Mentzel, H.-J., Moss, A., Schweizer, K., Stein, R., Werner-Rosen, K., Wieacker, P., Wiesemann, C., Wunsch, L., & Richter-Appelt, H. (2019). Variations of sex development: The first German interdisciplinary consensus paper. *Journal of Pediatric Urology*, *15*(2), 114–123.
- Kurrasch, D. M., Cheung, C. C., Lee, F. Y., Tran, P. V., Hata, K., & Ingraham, H. A. (2007). The Neonatal Ventromedial Hypothalamus Transcriptome Reveals Novel Markers with Spatially Distinct Patterning. *The Journal of Neuroscience*, *27*(50), 13624–13634.
- Larney, C., Bailey, T. L., & Koopman, P. (2014). Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. *Development*, *141*(11), 2195–2205.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *Journal of Molecular Endocrinology*, *19*(3), 207–226.
- Lee, P. A., Houk, C. P., Ahmed, S. F., Hughes, I. A., & Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES)/ European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) Consensus Group: Achermann, J., Ahmed, F., Baskin, L., Berenbaum, S., Bertelloni, S., Brock, J., Carmichael, P., Chase, C., Cohen-Kettenis, P., Conte, F., Donohoue, P., Driver, C., Drop, S., Eugster, E., Fujieda, K., Giedd, J., Green, R., Grumbach, M., Harley, V., Hines, M., Hiort, O., Hughes, I., Lee, P., Looijenga, L., McCullough, L., Mendoca, B., Meyer-Bahlburg, H., Migeon, C., Morel, Y., Mouriquand, P., Nordenström, A., Ransley, P., Rapaport, R., Reiner, W., Richter-Appelt, H., Rink, R., Rissman, E., Saenger, P., Sandberg, D., Schober, J., Spack, N., Thomas, B., Thyen, U.,

- Vilain, E., Warne, G., Wisniewski, A., Wilson, J., Woodhouse, C., Zucker, K. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics*, 118(2), e488–e500.
- Lee, P. A., Nordenström, A., Houk, C. P., Ahmed, S. F., Auchus, R., Baratz, A., Dalke, K. B., Liao, L.-M., Lin-Su, K., 3rd, L. H. J. L., Mazur, T., Meyer-Bahlburg, H. F. L., Mouriquand, P., Quigley, C. A., Sandberg, D. E., Vilain, E., Witchel, S., & Global DSD Update Consortium [European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE), Pediatric Endocrine Society (PES-NA), Australian Pediatric Endocrine Group (APEG), Asian Pacific Pediatric Endocrine Society (APPES), Japanese Society of Pediatric Endocrinology (JSPE), Sociedad Latinoamericana de Endocrinología Pediátrica (SLEP), Chinese Society of Pediatric Endocrinology and Metabolism (CSPM)]. (2016). Global Disorders of Sex Development Update since 2006: Perceptions, Approach and Care. *Hormone Research in Paediatrics*, 85(3), 158–180.
- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J. I., & Melner, M. H. (1997). Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(12), 7960–7967.
- Lewis, A. E., Rusten, M., Hoivik, E. A., Vikse, E. L., Hansson, M. L., Wallberg, A. E., & Bakke, M. (2008). Phosphorylation of Steroidogenic Factor 1 Is Mediated by Cyclin-Dependent Kinase 7. *Molecular Endocrinology*, 22(1), 91–104.
- 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. (2007). Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 92(3), 991–999.
- Little, T. H., Zhang, Y., Matulis, C. K., Weck, J., Zhang, Z., Ramachandran, A., Mayo, K. E., & Radhakrishnan, I. (2006). 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. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(4), 831–843.
- 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. (2009).

- Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(12), 1200–1210.
- Lourenço, D., Brauner, R., Rybczynska, M., Nihoul-Fékété, C., McElreavey, K., & Bashamboo, A. (2011). Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1597–1602.
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481–490.
- Mallet, D., Bretones, P., Michel-Calemard, L., Dijoud, F., David, M., & Morel, Y. (2004). Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(10), 4829–4832.
- Manuylov, N. L., Fujiwara, Y., Adameyko, I. I., Poulat, F., & Tevosian, S. G. (2007). The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Developmental Biology*, 307(2), 356–367.
- Mazen, I., Abdel-Hamid, M., Mekkawy, M., Bignon-Topalovic, J., Boudjenah, R., Gammal, M. E., Essawi, M., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2016). Identification of NR5A1 Mutations and Possible Digenic Inheritance in 46,XY Gonadal Dysgenesis. *Sexual Development*, 10(3), 147–151.
- Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews*, 9(3), 295–318.
- Moore, J. H., & Williams, S. M. (2009). Epistasis and its implications for personal genetics. *American Journal of Human Genetics*, 85(3), 309–320.
- Morohashi, K. (1997). The ontogenesis of the steroidogenic tissues. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2(2), 95–106.
- Munsterberg, A., & Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, 113(2), 613–624.
- Murphy, C., Allen, L., & Jamieson, M. A. (2011). Ambiguous Genitalia in the Newborn: An Overview and Teaching Tool. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 24(5), 236–250.
- Camats, N., Pandey, A. V., Fernandez-Cancio, M., Andaluz, P., Janner, M., Toran, N., Moreno, F., Bereket, A., Akcay, T., García-García, E., Munoz, M. T., Gracia, R., Nistal, M., Castano, L., Mullis, P.E., Carrascosa, A., Audí, L., Flück, C.E. (2012). Ten Novel Mutations in the NR5A1

- Gene Cause Disordered Sex Development in 46,XY and Ovarian Insufficiency in 46,XX Individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7), E1304.
- New, M. I., Abraham, M., Gonzalez, B., Dumic, M., Razzaghy-Azar, M., Chitayat, D., Sun, L., Zaidi, M., Wilson, R. C., & Yuen, T. (2013). Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(7), 2611–2616.
- Nikolova, G., & Vilain, E. (2006). Mechanisms of Disease: transcription factors in sex determination—relevance to human disorders of sex development. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*, 2(4), 231–238.
- Ono, M., & Harley, V. R. (2013). Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature Reviews Endocrinology*, 9(2), 79–91.
- Oppelt, P., Strissel, P. L., Kellermann, A., Seeber, S., Humeny, A., Beckmann, M. W., & Strick, R. (2005). DNA sequence variations of the entire anti-Müllerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer–Rokitanski–Küster–Hauser syndrome. *Human Reproduction*, 20(1), 149–157.
- Ostrer, H. (2008). 46,XY Disorder of Sex Development and 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis. In R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. Bean, T. D. Bird, C.-T. Fong, H. C. Mefford, R. J. Smith, & K. Stephens (Eds.), *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle. Abgerufen am 30.10.2015, von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1547/>
- Paliwal, P., Sharma, A., Birla, S., Kriplani, A., Khadgawat, R., & Sharma, A. (2011). Identification of novel SRY mutations and SF1 (NR5A1) changes in patients with pure gonadal dysgenesis and 46,XY karyotype. *Molecular Human Reproduction*, 17(6), 372–378.
- Panja, S., Saha, S., Jana, B., & Basu, T. (2006). Role of membrane potential on artificial transformation of *E. coli* with plasmid DNA. *Journal of Biotechnology*, 127(1), 14–20.
- Paris, F., De Ferran, K., Bhangoo, A., Ten, S., Lahlou, N., Audran, F., Servant, N., Poulat, F., Philibert, P., & Sultan, C. (2011). Isolated `idiopathic` micropenis: Hidden genetic defects? *International Journal of Andrology*, 34(6 Pt 2), e518–e525.

- Parker, K. L., Rice, D. A., Lala, D. S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N. A., Stallings, N., & Schimmer, B. P. (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Progress in Hormone Research*, *57*, 19–36.
- Parker, K. L., & Schimmer, B. P. (1997). Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Reviews*, *18*(3), 361–377.
- Park, S. Y., Tong, M., & Jameson, J. L. (2007). Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development. *Endocrinology*, *148*(8), 3704–3710.
- Paulozzi, L. J. (1999). International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives*, *107*(4), 297–302.
- Pezzi, V., Sirianni, R., Chimento, A., Maggiolini, M., Bourguiba, S., Delalande, C., Carreau, S., Andò, S., Simpson, E. R., & Clyne, C. D. (2004). Differential Expression of Steroidogenic Factor-1/Adrenal 4 Binding Protein and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)/Fetoprotein Transcription Factor in the Rat Testis: LRH-1 as a Potential Regulator of Testicular Aromatase Expression. *Endocrinology*, *145*(5), 2186–2196.
- Philibert, P., Polak, M., Colmenares, A., Lortat-Jacob, S., Audran, F., Poulat, F., & Sultan, C. (2011). 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. *Fertility and Sterility*, *95*(5), 1788.e5–e1788.e9.
- Philibert, P., Zenaty, D., Lin, L., Soskin, S., Audran, F., Léger, J., Achermann, J. C., & Sultan, C. (2007). Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5a1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *22*(12), 3255–3261.
- Ping, J., Wang, J., Liu, L., Yan, Y., Liu, F., Lei, Y., & Wang, H. (2014). Prenatal caffeine ingestion induces aberrant DNA methylation and histone acetylation of steroidogenic factor 1 and inhibits fetal adrenal steroidogenesis. *Toxicology*, *321*, 53–61.
- Pizzuti, A., Sarkozy, A., Newton, A. L., Conti, E., Flex, E., Cristina Digilio, M., Amati, F., Gianni, D., Tandoi, C., Marino, B., Crossley, M., & Dallapiccola, B. (2003). Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot. *Human Mutation*, *22*(5), 372–377.

- Protocols & Applications Guide: Bioluminescent Reporter Gene Assays.* (2015). Promega Corporation.
Abgerufen 14.09.2015, von <https://www.promega.de/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/bioluminescent-reporters/>
- QuickChange® Site-directed Mutagenesis Kit.* (2015). Catalog #200518 and #200519. Agilent Technologies. Abgerufen am 14.09.2015, von <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/200518.pdf>
- Reuter, A. L., Goji, K., Bingham, N. C., Matsuo, M., & Parker, K. L. (2007). A novel mutation in the accessory DNA-binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency. *European Journal of Endocrinology*, 157(2), 233–238.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424.
- Robevska, G., van den Bergen, J. A., Ohnesorg, T., Eggers, S., Hanna, C., Hersmus, R., Thompson, E. M., Baxendale, A., Verge, C. F., Lafferty, A. R., Marzuki, N. S., Santosa, A., Listyasari, N. A., Riedl, S., Warne, G., Looijenga, L., Faradz, S., Ayers, K. L., & Sinclair, A. H. (2018). Functional characterization of novel NR5A1 variants reveals multiple complex roles in disorders of sex development. *Human Mutation*, 39(1), 124–139.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Schagat, T., & Kopish, K. (2010). *Optimize Transfection of Cultured Cells.* Promega Corporation.
Abgerufen 14.09.2015, von <https://www.promega.de/resources/pubhub/optimize-transfection-of-cultured-cells/>
- Schlaubitz, S., Yatsenko, S. A., Smith, L. D., Keller, K. L., Vissers, L. E., Scott, D. A., Cai, W. W., Reardon, W., Abdul-Rahman, O. A., Lammer, E. J., Lifchez, C. A., Magenis, E., Veltman, J. A., Stankiewicz, P., Zabel, B. U., & Lee, B. (2007). Ovotestes and XY sex reversal in a female with an interstitial 9q33.3-q34.1 deletion encompassing NR5A1 and LMX1B causing features of Genitopatellar syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 143A(10), 1071–1081.

- Schoder, V., Himmelmann, A., & Wilhelm, K.P. (2006). Preliminary testing for normality: some statistical aspects of a common concept. *Clinical and Experimental Dermatology*, 31(6), 757–761.
- Schorderet, D. F. (1994). [Polymerase chain reaction: basic principles]. *Schweizerische Rundschau Für Medizin Praxis = Revue Suisse De Médecine Praxis*, 83(20), 588–594.
- Scott, H. M. (2007). The Role of Androgens in Testicular Development and Dysgenesis. *Edinburgh Medical School thesis and dissertation collection*, abgerufen 11.11.2015, von: <https://www.era.lib.ed.ac.uk/handle/1842/2687>
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., & Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology*, 274(2), 271–279.
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453(7197), 930–934. <https://doi.org/10.1038/nature06944>
- Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2012). Genetic control of testis development. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 7(1-3), 21–32.
- Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., & Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125(6), 769–784.
- Shendure, J. A., Porreca, G. J., Church, G. M., Gardner, A. F., Hendrickson, C. L., Kieleczawa, J., & Slatko, B. E. (2011). Overview of DNA sequencing strategies. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 7, Unit7.1.
- Shih, M.-C. M., Chiu, Y.-N., Hu, M.-C., Guo, C., & Chung, B. (2011). Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 336(1), 80–84.
- Shinoda, K., Lei, H., Yoshii, H., Nomura, M., Nagano, M., Shiba, H., Sasaki, H., Osawa, Y., Ninomiya, Y., & Niwa, O. (1995). Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 204(1), 22–29. <https://doi.org/10.1002/aja.1002040104>
- Soardi, F. C., Borchers Coeli, F., Maciel-Guerra, A. T., Guerra-Júnior, G., Palandi de Mello, M. (2010). Complete XY gonadal dysgenesis due to p.D293N homozygous mutation in the NR5A1 gene: A case study. *Journal of Applied Genetics*, 51(2), 223–224.

- Sreenivasan, R., Ludbrook, L., Fisher, B., Declosmenil, F., Knowler, K. C., Croft, B., Bird, A. D., Ryan, J., Bashamboo, A., Sinclair, A. H., Koopman, P., McElreavey, K., Poulat, F., & Harley, V. R. (2018). Mutant NR5A1/SF-1 in patients with disorders of sex development shows defective activation of the SOX9 TESCO enhancer. *Human Mutation*, 39(12), 1861–1874.
- Sugawara, T., Holt, J. A., Kiriakidou, M., & Strauss, J. F. (1996). Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*, 35(28), 9052–9059.
- Swartz, J. M., Ciarlo, R., Guo, M. H., Abrha, A., Weaver, B., Diamond, D. A., Chan, Y.-M., & Hirschhorn, J. N. (2017). A 46,XX ovotesticular disorder of sex development likely caused by a SF-1 (NR5A1) variant. *Hormone Research in Paediatrics*, 87(3), 191–195.
- Tajima, T., Fujiwara, F., & Fujieda, K. (2009). 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. *Endocrine Journal*, 56(4), 619–624.
- Takayama, K., Morohashi, K., Honda, S., Hara, N., & Omura, T. (1994). Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. *Journal of Biochemistry*, 116(1), 193–203.
- Tantawy, S., Lin, L., Akkurt, I., Borck, G., Klingmüller, D., Hauffa, B. P., Krude, H., Biebermann, H., Achermann, J. C., & Köhler, B. (2012). Testosterone production during puberty in two 46, XY patients with disorders of sex development and novel NR5A1 (SF-1) mutations. *European Journal of Endocrinology*, 167(1), 125–130.
- Tantawy, S., Mazen, I., Soliman, H., Anwar, G., Atef, A., El-Gammal, M., El-Kotoury, A., Mekkawy, M., Torkey, A., Rudolf, A., Schrupf, P., Grüters, A., Krude, H., Dumargne, M.-C., Astudillo, R., Bashamboo, A., Biebermann, H., Köhler, B. (2014). 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. *European Journal of Endocrinology*, 170(5), 759–767.
- Technical Manual: Dual-Glo® Luciferase Assay System*. (2015). Promega Corporation. Abgerufen 10.09.2015, von: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-glo-luciferase-assay-system-protocol.pdf?la=en>

- Technical Manual: Fugene® 6 Transfection Reagent.* (2011). Promega Corporation. Abgerufen 14.09.2015, von: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-6-transfection-reagent-protocol.pdf>
- Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M., & Orkin, S. H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, 129(19), 4627–4634.
- Tremblay J. J., Robert, N. M., Viger, R. S. (2001). Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(9), 1636–1650.
- Tremblay, J. J., & Viger, R. S. (2003). A mutated form of steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E) that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 42637–42642.
- Val, P., Lefrançois-Martinez, A.-M., Veyssi re, G., & Martinez, A. (2003). SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nuclear Receptor*, 1(1), 8.
- van der Zanden, L. F. M., van Rooij, I. a. L. M., Feitz, W. F. J., Franke, B., Knoers, N. V. a. M., & Roeleveld, N. (2012). Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Human Reproduction Update*, 18(3), 260–283.
- van Silfhout, A., Boot, A. M., Dijkhuizen, T., Hoek, A., Nijman, R., Sikkema-Raddatz, B., & van Ravenswaaij-Arts, C. M. A. (2009). A unique 970kb microdeletion in 9q33.3, including the NR5A1 gene in a 46,XY female. *European Journal of Medical Genetics*, 52(2-3), 157–160.
- Vidal, V. P. I., Chaboissier, M.-C., de Rooij, D. G., & Schedl, A. (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics*, 28(3), 216–217.
- Viger, R. S., Mertineit, C., Trasler, J. M., & Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development (Cambridge, England)*, 125(14), 2665–2675.
- Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691.
- Voytas, D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Current Protocols in Immunology, Chapter 10, Unit 10.4.*

- 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. (2011). 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. *Hormone Research in Paediatrics*, 75(1), 70–77.
- Warr, N., & Greenfield, A. (2012). The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 559–577.
- White, S., Ohnesorg, T., Notini, A., Roeszler, K., Hewitt, J., Daggag, H., Smith, C., Turbitt, E., Gustin, S., van den Bergen, J., Miles, D., Western, P., Arboleda, V., Schumacher, V., Gordon, L., Bell, K., Bengtsson, H., Speed, T., Hutson, J., Warne, G., Harley, V., Koopman, P., Vilain, E., Sinclair, A. (2011). Copy Number Variation in Patients with Disorders of Sex Development Due to 46,XY Gonadal Dysgenesis. *PLoS ONE*, 6(3), e17793.
- Wilhelm, D., Hiramatsu, R., Mizusaki, H., Widjaja, L., Combes, A. N., Kanai, Y., & Koopman, P. (2007). SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10553–10560.
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M. J., Combes, A. N., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H., & Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Developmental Biology*, 287(1), 111–124.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., & Milbrandt, J. (1993). The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), 5794–5804.
- Yagi, H., Takagi, M., Kon, M., Igarashi, M., Fukami, M., & Hasegawa, Y. (2015). Fertility preservation in a family with a novel *NR5A1* mutation. *Endocrine Journal*, 62(3), 289–295.
- Yan, Y.-E., Liu, L., Wang, J.-F., Liu, F., Li, X.-H., Qin, H.-Q., & Wang, H. (2014). Prenatal nicotinic exposure suppresses fetal adrenal steroidogenesis via steroidogenic factor 1 (SF-1) deacetylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 277(3), 231–241.
- Yazawa, T., Imamichi, Y., Miyamoto, K., Umezawa, A., & Taniguchi, T. (2014). Differentiation of mesenchymal stem cells into gonad and adrenal steroidogenic cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), 203.

- Zangen, D., Kaufman, Y., Banne, E., Weinberg-Shukron, A., Abulibdeh, A., Garfinkel, B. P., Dweik, D., Kanaan, M., Camats, N., Flück, C., Renbaum, P., & Levy-Lahad, E. (2014, May 1). *Testicular differentiation factor SF-1 is required for human spleen development*.
- Zaytouni, T., Efimenko, E. E., & Tevosian, S. G. (2011). 4 - GATA Transcription Factors in the Developing Reproductive System. In J. C. D. and S. F. G. Theodore Friedmann (Ed.), *Advances in Genetics* (Vol. 76, pp. 93–134). Academic Press.
- Zhang, J., Wu, Y. (2005). Likelihood-ratio tests for normality. *Computational Statistics & Data Analysis*, 49(3), 709–721.
- Zhou, P., He, A., & Pu, W. T. (2012). Chapter five - Regulation of GATA4 Transcriptional Activity in Cardiovascular Development and Disease. In B. G. Bruneau (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 100, pp. 143–169). Academic Press.
- Zimmermann, S., Schwärzler, A., Buth, S., Engel, W., & Adham, I. M. (1998). Transcription of the Leydig Insulin-Like Gene Is Mediated by Steroidogenic Factor-1. *Molecular Endocrinology*, 12(5), 706–713.

Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Rebekka Astudillo, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung von heterozygoten Mutationen des Steroidogenetischen Faktors 1 (SF1/NR5A1) bei 46,XY Störungen der Geschlechtsentwicklung“ bzw. „Functional characterisation of heterozygous Steroidogenic Factor 1 (SF1/NR5A1) mutations in patients with XY-disorders of sex development“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Rebekka Astudillo hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Sally Tantawy, Inas Mazen, Hala Soliman, Ghada Anwar, Abeer Ate, Mona El-Gammal, Ahmed El-Kotoury, Mona Mekkawy, Ahmad Torky, Agnes Rudolf, Pamela Schrupf, Annette Grüters, Heiko Krude, Marie-Charlotte Dumargne, Rebekka Astudillo, Anu Bashamboo, Heike Biebermann and Birgit Köhler, 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, European Journal of Endocrinology, 2014

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der funktionellen Analyse sowie deren methodische Beschreibung, Darstellung in Fig. 3 und Interpretation in der Diskussion

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutztechnischen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

[Lebenslauf]

Publikationsliste

Publikation 1: Sally Tantawy, Inas Mazen, Hala Soliman, Ghada Anwar, Abeer Ate, Mona El-Gammal, Ahmed El-Kotoury, Mona Mekkawy, Ahmad Torky, Agnes Rudolf, Pamela Schrupf, Annette Grüters, Heiko Krude, Marie-Charlotte Dumargne, Rebekka Astudillo, Anu Bashamboo, Heike Biebermann and Birgit Köhler, 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, European Journal of Endocrinology, 2014

Danksagung

Ich bedanke mich bei all denjenigen, welche mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt, motiviert, gefordert und gefördert haben.

Zuerst gilt mein Dank PD Dr. Birgit Köhler für die Überlassung des spannenden Themas, der Betreuung meiner Promotion und ihrer aktiven Unterstützung meines fachlichen und wissenschaftlichen Interesses zu ihren Lebzeiten.

Ich bedanke mich ebenfalls herzlich bei Prof. Heiko Krude und Prof. Heike Biebermann und für die weitere Betreuung und Begutachtung der Dissertation, ihre hilfreichen Anregungen und ihre konstruktive Kritik vor dem Hintergrund ihrer breiten wissenschaftlichen Erfahrung und fachlichen Expertise.

Ich danke dem anregenden Team des Instituts für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie für die zahlreichen interessanten Debatten und Ideen, insbesondere auch Sabine Jyrch und Cigdem Cetindag für ihre Geduld und ihre Hilfsbereitschaft bei den kleinen und großen Herausforderungen der experimentellen Arbeit. Ich danke PhD Nooshin Khajavi für die gute Arbeitsatmosphäre in unserem Büro – es war eine Motivationsstätte. Mein Dank gilt auch Dr. Gunnar Kleinau für sein allzeit offenes Ohr für den wissenschaftlichen Austausch und die Erstellung der Abbildung 3.

Ich bedanke mich bei dem Team der humanen Entwicklungsgenetik, insbesondere PhD Anu Bashamboo und Joelle Bignon-Topalovic, für die methodische Einarbeitung während meines Forschungspraktikums am Institut Pasteur und die Bereitstellung des Ausgangsplasmids des humanen SF1-Wildtyps.

Mein Dank gilt ebenfalls Prof. Gromoll (Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie, Medizinische Fakultät Münster) für die Bereitstellung der Sertoli-Zelllinie, Dr. Francus Poulat (Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier) für den SOX9 Enhancer TESCO und Prof. Christof Dame (Klinik für Neonatalogie, Charité Berlin) für die Bereitstellung von GATA4.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern Angelika Hub und Néstor Astudillo, welche mir auch durch ihre Unterstützung diese Promotion ermöglicht haben und mich allzeit mental begleiten.