

Aus der Klinik für Kinder und Jugendmedizin I
(Direktor: Prof. Dr. Martin Schrappe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sequenzierung des NR5A1-Genlokus bei Patienten mit Besonderheiten der
Geschlechtsentwicklung unklarer Ursache

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von Gabriele Pascua
aus Wien

Kiel (2022)

1. Berichterstatter: Prof Dr. Paul-Martin Holterhus, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. Almuth Caliebe, Institut für Humangenetik

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 05.05.2023

gez.: Prof. Dr. Gunnar Cario

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen.....	2
1.1.1 Geschlechtliche Determinierung	2
1.1.2 Geschlechtliche Differenzierung.....	3
1.2 Gonadendysgenesie	5
1.3 NR5A1 und Steroidogenic factor-1 (SF-1)	6
1.4 NR5A1 und SF-1 auf molekulargenetischer Ebene	8
1.5 Androgenresistenz (Androgen Insensitivity Syndrome, AIS).....	8
1.5.1 AIS Typ II und APOD-Assay.....	9
1.6 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Ethikvotum	14
2.2 Patientenkohorten.....	15
2.2.1 Klinische Beschreibung der Patienten	16
2.2.2 Übersicht aller Patienten- Tabelle 1 und 2	17
Material	20
2.2.3 Geräte und Arbeitsinstrumente.....	20
2.2.4 Chemikalien und Kits.....	20
2.2.5 Verbrauchsartikel.....	21
Primer.....	21
Verdünnung der Primer	21
2.3 Methoden- Durchführung der molekularen Untersuchungen	21
2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	21
2.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen.....	22
2.3.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion.....	22
2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	23
2.3.6 Sanger-Sequenzierung	23
2.3.7 Durchführung	24
2.3.8 Aufreinigung der Sequenzierprodukte	24
2.3.9 Ablauf am Sequenzierer.....	25
2.4 Auswertung der DNA-Sequenzen.....	26
3 Ergebnisse.....	28
3.1 Identifizierte Mutationen im NR5A1 Gen, Übersicht.....	28
3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation der SF-1 Mutations-positiven Patienten.....	30
3.2.1 AIS Typ II-Patienten.....	30
3.2.1.1 Patient GF-161	30

3.2.1.2	Patient GF-257	31
3.2.1.3	Patient GF-259	32
3.2.2	Patienten mit DSD unklarer Genese	32
3.2.2.1	Patient GF-264	32
3.2.2.2	Patient GF-114	33
3.2.2.3	Patient GF-318	34
3.3	Dreidimensionale Modellierung der unbekannten Mutationen	35
3.3.1	Patient GF-257 (Glu330Asp)	35
3.3.2	Patient GF-259 (Asn44del)	35
3.3.3	Patient GF-264 (Arg39His)	36
3.3.4	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)	36
4	Diskussion.....	37
4.1	Patienten.....	38
4.1.1	AIS Typ II-Patienten.....	38
4.1.1.1	Patient GF-161 mit den Ser203Arg und Mutationen Pro205Hisfs*91	38
4.1.1.2	Patient GF-257 mit der Mutation Glu330Asp	40
4.1.1.3	Patient GF-259 mit der Mutation Asn44del	42
4.1.2	Patienten mit DSD unklarer Genese	43
4.1.2.1	Patient GF-264 mit der Mutation Arg39His	43
4.1.2.2	Patient GF-114 mit der Mutation Gly26Stopp	45
4.1.2.3	Patient GF-318 mit Missense Mutation im Intron-Bereich	46
4.2	Dreidimensionale Modellierung der Mutationen	47
4.3	Polymorphismus	48
4.4	Potentielle weitere Methoden der funktionellen Molekularbiologie.....	49
4.4.1	Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	49
4.4.2	Transaktivierungs-Assay	49
4.4.3	Chromatin-Immunpräzipitation- Assay.....	49
4.5	Fazit und Ausblick	50
4.6	Zusammenfassung	52
5	Anhang	54
5.1	Reaktionslösungen und Programme	54
5.2	Cycle-Sequencing	54
5.3	PCR-Bild der Exone 1 bis 7 des <i>NR5A1</i> am Probanden GF-14	55
5.4	Übersicht der Mutationen auf dem <i>NR5A1</i> -Gen	56
5.5	Liste der Mutationen.....	56
5.6	Ethikanträge	57
6	Danksagung	59
7	Quellenverzeichnis	60
8	Abbildungsverzeichnis.....	65
9	Tabellenverzeichnis.....	66

Abkürzungen

AIS	Androgen insensitivity syndrome, Androgenresistenz
AF	ligandenunabhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktions-Domäne
AG	Arbeitsgruppe
AMH	Anti-Müller-Hormon
APOD	Apolipoprotein D
CADD	Combined Annotation Dependent Depletion
DAX1	dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, Chromosome X-gene
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DHT	Dihydrotestosteron
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphate
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DSD	Differences of Sex Development
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EtOH	Ethanol
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GF	Genitalhautfibroblasten
GnRH	Gonadotropin-Releasing hormone
hCG	humanes Choriongonadotropin
INSL3	Insulin-like 3
LBD	liganden-bindende Domäne
LH	Luteinisierendes Hormon
MCU	Miktionszystourethrografie
n.a	nicht angegeben
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NR5A1	nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 gene
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
SF-1	Steroidogenic factor 1
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
SIFT	sorting intolerant from tolerant
SRD5	Steroid 5 alpha-reductase
SRY	Sex-Determining Region of Y protein
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
UCSC	University of California Santa Cruz
WT 1	Wilm's tumor protein

1 Einleitung

Das Thema rund um den Begriff „Differences of Sex Development (DSD)“ wurde in den letzten Jahren immer präsenter und ist mittlerweile bei der breiten Masse angelangt. Die aktuelle medizinische Terminologie richtet sich nach der Klassifikation, die unter diesem Oberbegriff 2005 in Chicago nach der Konsensuskonferenz eingeführt wurde [1]. Bei DSD handelt es sich um eine Reihe von klinischen Diagnosen, die durch hormonelle, gonadale oder chromosomale Veränderungen Einfluss auf die Geschlechtsentwicklung haben [1],[2],[3]. Hierbei stimmt das geschlechtliche Erscheinungsbild nicht mit dem genetischen oder gonadalnen Geschlecht überein oder das Genital kann auch nicht eindeutig einem Geschlecht zugewiesen werden. Aufgrund des variablen klinischen Spektrums bei DSD ist eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp oft nicht möglich [4]. Die DSD-Klassifikation gemäß der Chicago-Konsensuskonferenz teilt in 3 große Gruppen ein: chromosomale DSD, 46,XY-DSD und 46,XX-DSD [1]. Für diese Arbeit von Bedeutung sind die Besonderheiten der Geschlechtsentwicklung bei 46, XY-DSD Patienten. Dazu gehören unter anderem Störungen des Androgenrezeptors wie die Androgenresistenz (AIS) oder Störungen der Gonadenentwicklung [1]. Mutationen in dem *NR5A1*-Gen, welches das Protein Steroidogenic factor 1 (SF-1) kodiert, können die Gonadenentwicklung beeinträchtigen und sind in der Regel mit einer Gonadendysgenesie assoziiert, die mit einer Störung der Testosteronsynthese einhergeht [5],[6]. AIS hingegen ist aufgrund eines Androgenrezeptor (AR)-defekts durch eine verminderte Virilisierung des äußeren und inneren Genitals charakterisiert bei erhaltener Androgenproduktion [7]. In der Vergangenheit berichteten Autoren von Patienten bei denen trotz normwertiger oder hohen Andogenspiegel heterozygote *NR5A1*-Mutationen bei weiterer Abklärung nachgewiesen wurden [8],[9]. Das spricht gegen die Gonadendysgenesie bei diesen Patienten und zeigt eher Ähnlichkeiten zu dem AIS. Die Arbeitsgruppe (AG) Pädiatrische Endokrinologie in Kiel stellte bei Patienten mit der klinischen Konstellation eines AIS in einer vorangegangenen Arbeit von Hornig et al. [10] eine Störung der zellulären Wirkungsvermittlung des AR fest und definierte bei Abwesenheit von Mutationen im AR-Gen diese Besonderheit AIS Typ II. Der hohe Andogenspiegel einiger 46, XY-DSD Patienten mit nachgewiesenen *NR5A1*-Mutationen [8],[9] könnte daher darauf hinweisen, dass SF-1 eine Funktion in der Androgenwirkungsvermittlung über den AR innehalt und daher über diesen Mechanismus, also AIS Typ II zu DSD führt. Das ist bislang nicht bekannt.

1.1 Grundlagen

Um die Funktion des vom *NR5A1* codierten SF-1 Proteins und die Auswirkung einer Mutation in diesem Gen bei 46,XY-Individuen besser verstehen zu können, ist eine Beschreibung der GeschlechtSENTWICKLUNG, welche in die geschlechtliche Determinierung und die Geschlechtsdifferenzierung eingeteilt werden kann, hilfreich. SF-1 ist an mehreren Ebenen sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen GeschlechtSENTWICKLUNG vertreten, sodass die Klinik einer Mutation in diesem Gen äußerst variabel sein kann.

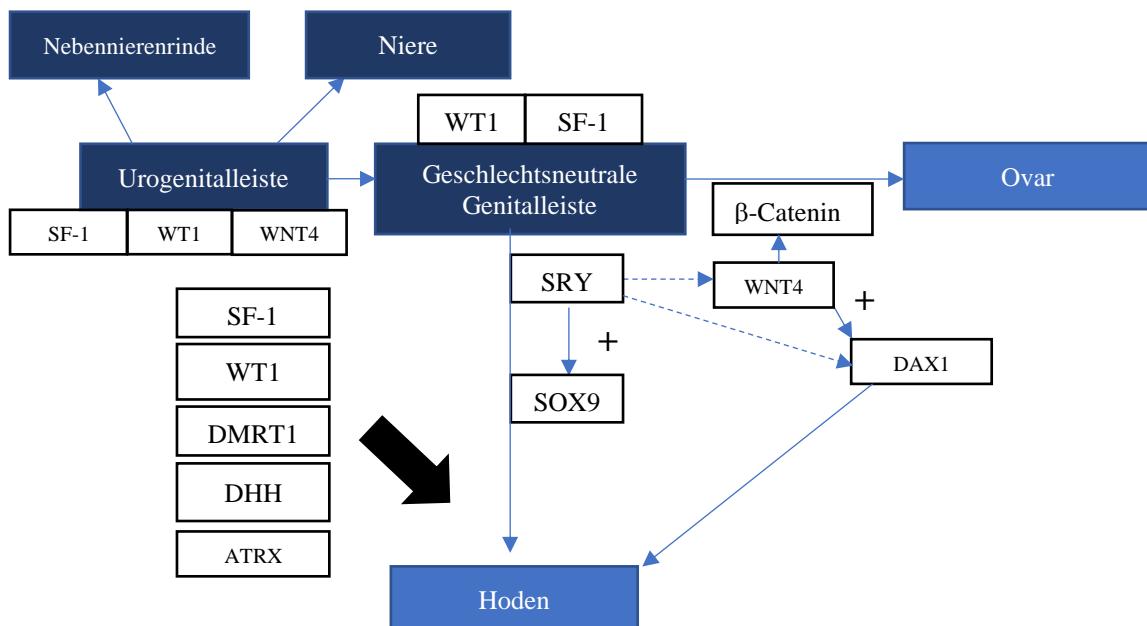


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der geschlechtlichen Determinierung nach Holterhus et al. [6] und Medonca et al. [2]. Aus der Urogenitalleiste, in der SF-1, WT 1 und WNT4 exprimiert werden, entwickeln sich die Nebennierenrinde, die Niere und die geschlechtsneutrale Genitalleiste, die entweder zum Ovar oder zu dem Hoden differenziert. SRY induziert die Ausschüttung von SOX-9 in den Prä-Sertoli Zellen und führt zu der Differenzierung der indifferenten Gonaden zu den Hoden. Gleichzeitig reguliert SRY WNT4 und DAX1 runter. Eine Duplikation der beiden Transkriptionsfaktoren antagonisiert die Hodenentwicklung, jedoch reguliert DAX1 auch die Entwicklung des Samenstrangs und der peritubulären myoiden Zellen, die später die Tubuli seminiferi (Hodenkanälchen) umgeben. SF-1, WT1, DMRT1, DHH und ATRX sind auch in der männlichen Geschlechtsbestimmung involviert. Bei der Entwicklung zum Ovar spielt das WNT4 und das von ihm hochregulierte β-Catenin eine wichtige Rolle. ATRX: ATP-dependent helicase ATRX, X-linked helicase II, DAX1: dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region in chromosom X gene, DHH: Desert hedgehog, DMRT1: Doublesex and mab-3-related transcription factor 1, SF-1: Steroidogenic factor 1, SOX9: SRY-Box Transcription Factor, SRY: Sex Determining Region Y protein, WNT4: Protein codiert durch wingless-type MMTV integration site family member 4 gene, WT 1: Wilms' tumor protein.

1.1.1 Geschlechtliche Determinierung

Schon in der Urogenitalleiste, welche sich später in die Nieren, in die Nebennierenrinde und in die Gonaden, genauer zuerst in die geschlechtsneutrale Genitalleiste bzw. in die bipotente Gonade, differenziert, werden neben den Transkriptionsfaktoren wie dem Wilms'tumor protein (WT 1) und dem WNT4 (Protein codiert durch das *Wingless-Type MMTV Integration Site Family*-Gen) auch das SF-1 exprimiert [2],[6]. Das SF-1 und das WT 1, welche in den Gonaden weiter ausgeschüttet werden, regulieren SRY (Sex-Determining Region of Y protein) hoch. Dadurch erfolgt eine Heraufregulation des SOX9 (SRY-Box Transcription

Factor) und initiiert in den Prä-Sertoli-Zellen die Entwicklung von indifferenten Gonaden zu den Hoden [11]. Mutationen in mehreren an der geschlechtlichen Determinierung beteiligten Genen (siehe Abbildung 1) können zu Gonadendysgenesien in Kombination mit typischen Funktions- und Entwicklungsstörungen, zum Beispiel der Nieren oder des Skelettsystems, führen [6].

1.1.2 Geschlechtliche Differenzierung

In der Geschlechtsdifferenzierung werden Hormone, welche die Entwicklung in männliche äußere und innere Genitalien induzieren, in den Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen produziert, wobei das Testosteron in den Leydig-Zellen produziert wird und die Sertoli-Zellen, welche die Bluthodenschranke bilden, das Testosteron aufnehmen und für die Spermatogenese bereitstellen können [12],[13]. Bereits ab einem Alter von 8. Wochen können die ersten Leydig-Zellen nachgewiesen werden [14]. Die testikuläre Testosteronproduktion beginnt mit der Stimulation durch das humane Choriongonadotropin (hCG) über den Luteinisierenden Hormon (LH)-Rezeptor [13],[15]. In den Sertoli-Zellen sind das SF-1 und andere Faktoren an der Ausschüttung des Anti-Müller-Hormons (AMH) beteiligt (Abbildung 2). Das AMH bindet an seinen Rezeptor und stimuliert die Rückbildung der Müller'schen Gänge [2]. Das SF-1 ist in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung der Leydig-Zellen wesentlich und in den Leydig-Zellen selbst stimuliert das SF-1 unter anderem die Expression von CYP11A1, CYP17, Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) und dem LH-Rezeptor, um die Steroidbiosynthese zu regulieren, sodass Testosteron ausgeschüttet werden kann [16],[17].

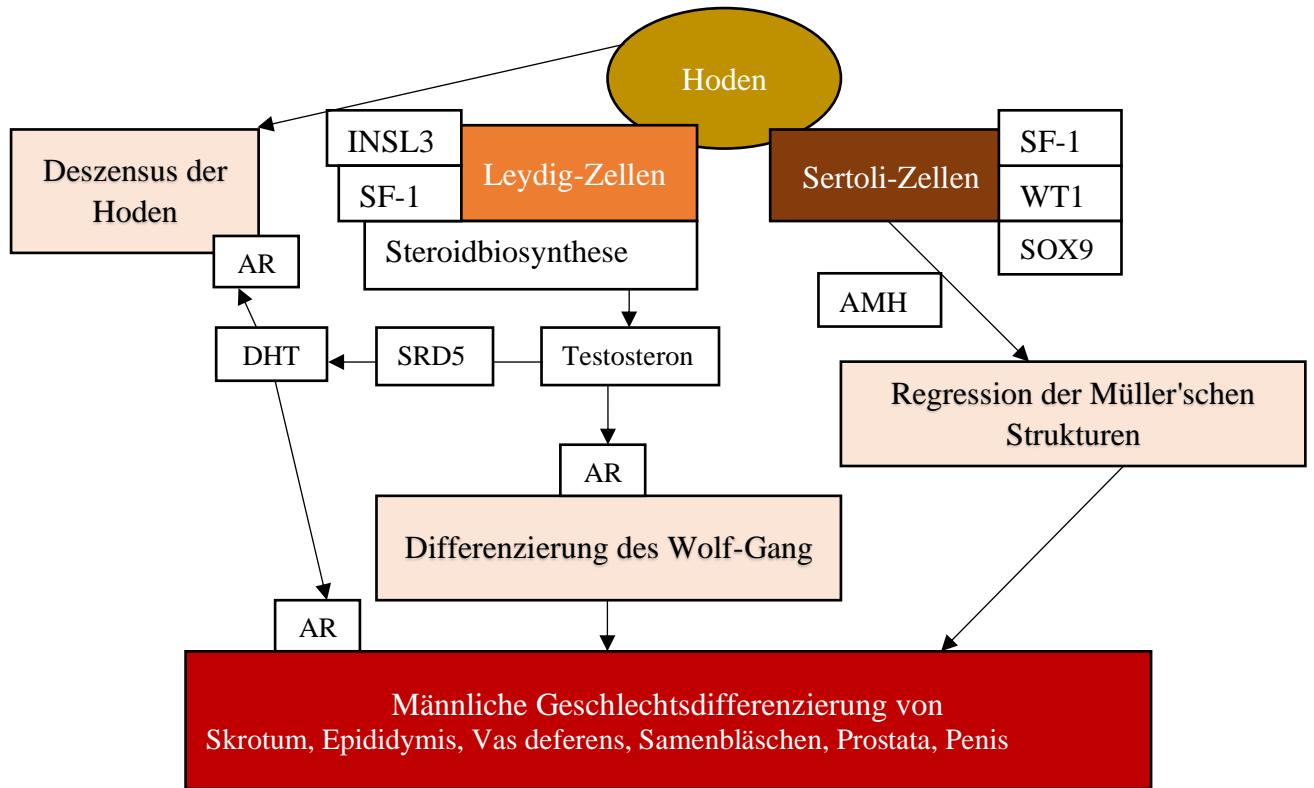


Abbildung 2: nach Medonca et al. [2] und Welsh et al. [19]. Vereinfachte Darstellung der männlichen Geschlechtsdifferenzierung mit dem Fokus auf das SF-1, das in den Leydig-Zellen die Steroidbiosynthese reguliert und in den Sertoli-Zellen an der Ausschüttung von AMH beteiligt ist, welches die Regression der Müller'schen Strukturen induziert. Das in den Leydig-Zellen produzierte Testosteron bindet an den AR und bewirkt die Ausdifferenzierung des Wolff'schen Ganges. Durch die 5 α -Reduktase (SRD5) wird das Testosteron zu DHT umgewandelt. Das in den Leydig-Zellen exprimierte INSL3 stimuliert den Deszensus der Hoden. AMH: Anti-Müller Hormon, AR: Androgenrezeptor, DHT: Dihydrotestosteron, INSL3: Insulin-like 3, SOX9: SRY-Box Transcription Factor 9, SRD5: Steroid 5 alpha-reductase, SF-1: Steroidogenic factor-1, WT1: Wilms' tumor protein 1.

Das Testosteron und das durch 5 α -Reduktase Typ 2 (SRD5), codiert durch das SRD5A2-Gen, umgewandelte Dihydrotestosteron (DHT) binden an den AR und induzieren die männliche Differenzierung. Das bedeutet, dass das Testosteron die Ausdifferenzierung des Wolff'schen Ganges in den Ductus epididymidis, Hauptbestandteil der Nebenhoden und in den Vas deferens, den Samenleiter bewirkt. Das DHT induziert durch Bindung an den AR die Ausbildung der Prostata, des Skrotums und des Penis [6],[18],[19]. Die Leydig-Zellen produzieren INSL 3, dessen Expression unter anderem durch das NR5A1 gesteigert wird und zum Deszensus der Hoden aus der Bauchhöhle führt [2],[17]. Das äußere Genital entwickelt sich bei beiden Geschlechtern aus dem Tuberculum genitale bzw. dem Genitalhöcker, den Urethralfalten und dem Geschlechtswulst [20]. Unter Androgenwirkung verlängert sich dieser Genitalhöcker beim Mann und formt den Penis. Nach Fusion der Urethralfalten entsteht die Urogenitalrinne, die den Harnröhrenschwellkörper bildet und aus dem Geschlechtswulst entsteht das Skrotum [21].

Bei Abwesenheit von Testosteron und dem AMH entwickeln sich die Müller'schen Gänge zu Uterus und Eileitern; aus dem oberen Anteil entstehen die Tuben, aus dem unteren Anteil zuerst der Genitalstrang der schließlich zum Uterus und zu den oberen zwei Dritteln der Vagina wird [6],[22],[23]. Das untere Drittel der Vagina entsteht aus dem Sinus urogenitalis [6],[22],[23]. Die Differenzierung der äußeren weiblichen Genitale erfordert keine Androgenwirkung: Der Genitalhöcker entwickelt sich zur Klitoris, die Urogenitalrinne bildet die inneren und der Geschlechtswulst bildet die äußeren Schamlippen [19],[20].

Bei Frauen wird das SF-1 in den Theka- und Granulosazellen exprimiert [18]. Eine *NR5A1*-Mutation kann zu einem Verlust der ovariellen Funktion führen, weshalb man davon ausgeht, dass das *NR5A1* Gene reguliert, die wichtig für die ovarielle Steroidgenese sowie für die Entwicklung und Differenzierung der Follikel sind [24]. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur Mutationen in Genen wie der Follikelstimulierende Hormon (FSH)-Rezeptor, GALT1 (Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase), FOXL2 (Forkhead-Box-Protein L2) und IINHIBIN α mit der primären Ovarialinsuffizienz (POI) assoziiert sind [25],[26], sondern auch Mutationen des *NR5A1*-Gens ursächlich für diese Diagnose sein können [27].

1.2 Gonadendysgenesie

Ursachen einer Gonadendysgenesie sind vielfältig und können durch numerische Aberration der Geschlechtschromosomen verursacht werden, aber auch Mutationen wie Deletionen oder Duplikationen von Genen, die vor allem in der geschlechtlichen Determinierung hoch exprimiert werden, können ursächlich sein [1],[6]. In der DSD-Klassifikation gemäß der Chicago-Konsensuskonferenz ist die Gonadendysgenesie auch in jeder der 3 Gruppen (chromosomale DSD, 46,XY-DSD und 46,XX-DSD) vertreten [1]. Es handelt sich dabei um Fehlbildungen der Keimdrüsen, beim männlichen Geschlecht sind es die Hoden, bei dem weiblichen Geschlecht das Ovar bzw. die Eierstöcke [28]. Die Hoden sind stattdessen nur als sogenannte „Streak-Gonaden“ bindegewebig angelegt, sodass durch einen Defekt oder Mangel von Leydig-Zellen keine gonadale Testosteronbildung möglich ist und Betroffene ein äußeres weibliches Genital zeigen [6],[23]. Des Weiteren kann bei Fehlbildung der Gonaden das AMH nicht gebildet werden und somit können die Müller'schen Strukturen sich nicht zurückbilden. Der sonografische Nachweis bzw. die Abwesenheit dieser Strukturen spielt für die Diagnosestellung eine wichtige Rolle [6]. Die Gonadendysgenesie umfasst somit Störungen, bei der die Zellen in den Gonaden funktionsuntüchtig sind und eine adäquate Androgenproduktion nicht möglich ist.

1.3 *NR5A1* und Steroidogenic factor-1 (SF-1)

Das SF-1 ist ein Transkriptionsfaktor und Mitglied der nukleären Rezeptor Subfamilie 5 A1, welches durch das *NR5A1*-Gen codiert wird. Dieses Gen ist auf dem Chromosom 9q.33.3 lokalisiert [29]. Initial wurde SF-1 als transkriptionaler Regulator von Cytochrome p450 Steroidhydroxylasen identifiziert [17]. SF-1 hat besonders im endokrinen und im reproduktiven System eine regulierende Funktion inne und beeinflusst außerdem viele Faktoren, die in der Entwicklung dieser hormonellen Strukturen involviert sind [30]. Wie im Kapitel 1.1.1 beschrieben, wird das SF-1 schon in der Urogenitalleiste exprimiert und gilt als der erste Marker der gonadalen und adrenalen Differenzierung [17]. In mehreren Experimenten mit Knockout-Mäusen wurde demonstriert, dass das SF-1 für die Entwicklung der Nebenniere und der Gonaden erforderlich ist [5],[29],[31]. Es gibt auch mehrere Hinweise auf SF-1 regulierende Zielgene in der Hypophyse und im ventromedialen Hypothalamus [31],[32].

NR5A1- Mutationen repräsentieren zurzeit etwa 20% aller Fälle, die mit 46,XY-DSD aufgrund gonadaler Dysgenesie assoziiert sind [29]. Auf der Suche nach einer *NR5A1*-Mutation beim Menschen lag der Fokus zuerst bei 46,XY Individuen, die entweder eine inkomplette oder eine komplett Gonadendysgenesie zeigten und eine primäre Nebennierenrinden-Insuffizienz basierend auf der limitierten Information, die man damals über das *NR5A1*-Gen hatte. Die erste Mutation mit diesem Phänotyp wurde im Jahre 1999 von Achermann et al. [33] festgestellt. Die 46, XY-Patientin zeigte eine Nebennierenrindeninsuffizienz zusätzlich zu einer Gonadendysgenesie und eine Klinik mit weiblichen Genitalien und den Nachweis eines Uterus und einer rudimentär angelegten Vagina. Es handelte sich um eine heterozygote Mutation, p.G35E in der P-Box, eine Region, die wesentlich ist in der Bindung von SF-1 an seine Zielgene. Jedoch sind mittlerweile viele Mutationen auf dem ganzen *NR5A1*-Gen bekannt, die mit einem 46,XY DSD assoziiert sind und keine Nebennierenrindeninsuffizienz zeigen [29],[34],[35]. Die meisten dieser *NR5A1*-Mutationen bei 46,XY DSD Patienten entstehen als Frameshifts, durch eine Missense- oder durch eine Nonsense-Veränderung. Ein Großteil dieser Mutationen ist heterozygot und entsteht als Neumutation. Ein Drittel davon scheint geschlechtsspezifisch vererbt zu sein, da die Mutter selbst nicht von einer ovariellen Dysfunktion betroffen ist, jedoch die Söhne symptomatisch sind [5],[9],[36]. Beim Menschen wurden bisher 3 homozygote Mutationen beschrieben [4],[37],[38] die einen partiellen Funktionsverlust statt eines kompletten Verlustes des Gens in Transaktivations-Assays zeigten, sodass die Fertilität bei 46,XY Individuen weiterhin erhalten ist.

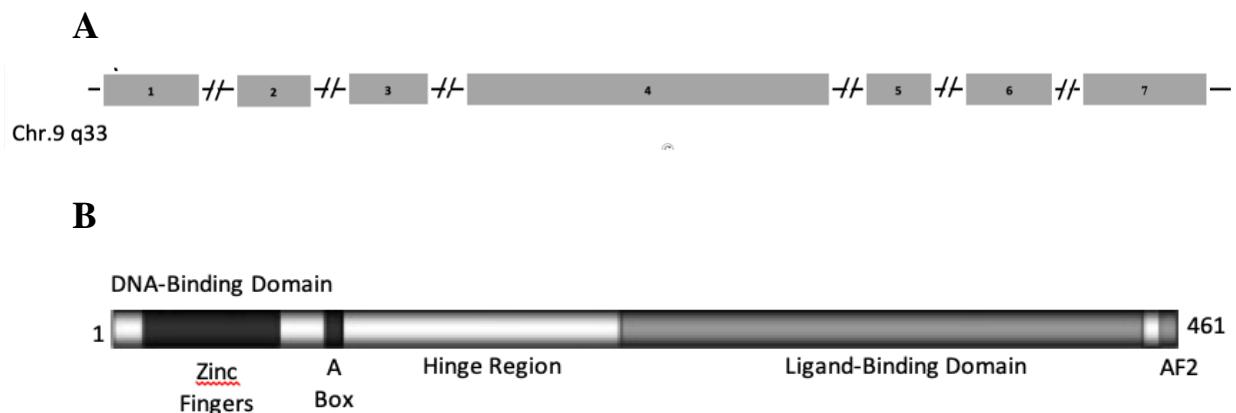
Nach Untersuchung mehrerer Fälle von 46,XY Patienten mit Mutationen im *NR5A1* geht man mittlerweile von einem sehr weiten klinischen Spektrum aus. Diese Patienten können sowohl eine Gonadendysgenesie als auch Müller'sche oder Wolff-Strukturen und eine Nebennierenrindeninsuffizienz aufweisen [5]. *NR5A1*-Mutationen sind auch mit Klitoromegalie und äußerem weiblichen Genitalien assoziiert [39]. Des Weiteren konnte bei unterschiedlichen Patienten auch eine Hypospadie, ein Mikropenis, eine Anorchie und Infertilität festgestellt werden [40]. Bei 46,XX Individuen kann eine *NR5A1*-Mutation zu einer primären oder sekundären Amenorrhö und zu einer Ovarialinsuffizienz mit erhöhten LH- und FSH-Werten und erniedrigten Östrogen-Werten führen [41]. Dass eine *NR5A1*-Mutation auch mit variablen Hormonwerten, besonders des FSH, LH, Testosteron und AMH, einhergeht, erschwert die Bestätigung der Diagnose [4],[9],[30],[33]. Diese klinische Variabilität der *NR5A1*-Mutationen unterliegt unter anderem vermutlich der Expression von SF-1 an vielen Stellen der Geschlechtsentwicklung und der Lokalisation der Mutation auf dem *NR5A1*-Gen, jedoch sind die wesentlichen Mechanismen für den unterschiedlichen Effekt der *NR5A1*-Mutationen größtenteils unklar [17].

Mehrere Fälle [4],[8],[9],[39], zeigen, dass eine *NR5A1*- Mutation klinisch dem AIS ähneln kann. Coutant et al. stellen einen sehr eindrücklichen Fall mit zwei 46,XY Kindern vor, bei denen man anfangs aufgrund des Phänotyps von einem partiellen AIS (PAIS) ausging, aber im Nachhinein bei beiden dieselbe heterozygote *NR5A1*- Mutation feststellte. Beide zeigten ein nicht eindeutiges äußerliches Genital ohne Nachweis von Müller'schen Strukturen und ohne Nebennierenrindeninsuffizienz. Die Hormonwerte Testosteron, AMH, Inhibin B, FSH und LH wurden in den ersten Wochen nach der Geburt regelmäßig untersucht. Bei dem einen Kind zeigten sich altersgerechte Hormonwerte, sodass man bei dem Kind von einem PAIS ausging, wobei jedoch vor allem erhöhte Werte für Testosteron den Verdacht eines AIS erhärten würden. Bei dem anderen Kind waren dieselben Werte hingegen erniedrigt; FSH und LH waren laut den Autoren in Hinblick auf einen Hypogonadismus derart erniedrigt, dass sie eher von einem Defekt der Gonadotropin-Ausschüttung ausgingen. Eine Sequenzierung vom AR- und vom *NR5A1*-Gen wurde bei beiden Kindern sowie bei der Mutter durchgeführt und es wurde schließlich festgestellt, dass alle die gleiche c.536delC Frameshift Mutation im *NR5A1*-Gen besaßen. Diese Mutation im Exon 4 beendet die Translation frühzeitig und es entsteht ein Protein ohne die liganden-bindende Domäne (LBD) und ohne die ligandenunabhängigen transkriptionellen Aktivierungsfunktions(AF-2) -Domäne. Dieser Fall weist auf eine interindividuelle Ausprägung dieser *NR5A1*- Mutation, die hier bezogen auf die

Hormonkonstellation eher auf eine Androgenresistenz hinweist als auf eine Gonadendysgenesie.

1.4 *NR5A1* und SF-1 auf molekulargenetischer Ebene

Insgesamt hat das *NR5A1*-Gen sieben Exons (Abbildung 3.A). Nicht nur die Exons zeigen eine hohe Konservierung, aber auch mehrere hoch konservierte intronische Bereiche sind vorzufinden, was auf einen weitgehend unveränderten Erhalt mehrerer Anteile der Sequenz im Laufe der Evolution hinweist [17],[42]. Die Regionen des SF-1 Proteins werden unterteilt in eine DNA- Bindungsdomäne (DBD) eine Hinge Region und eine LBD [17] (Abbildung 3.B). Für die Erkennung und Bindung an DNA besitzt das SF-1 in der DBD zwei Zinkfingerdomänen mit einer proximalen (P) Box und einer distalen (D) Box sowie einer hochkonservierten Ftz-



F1 Box [17]. Im SF-1 befinden sich außerdem eine prolinreiche Sequenz in der Hinge Region und eine AF-2 Transaktivierungsdomäne in der LBD [43].

*Abbildung 3: angelehnt an Philibert et al.[83]. A: Genomische Anordnung des *NR5A1* mit den nummerierten Exons 1 bis 7. B: Struktur des SF-1 Proteins. AF-1 (nicht angezeigt) befindet sich in der Hinge-Region. AF2: Transaktivierungsregion am C-Terminus*

1.5 Androgenresistenz (Androgen Insensitivity Syndrome, AIS)

Der AR ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, welcher durch ein Single-copy-Gen, bestehend aus acht Exons auf dem X-Chromosom codiert wird [44]. Bei regelrechter AR-Funktion wird auf molekularer Ebene durch Bindung von Androgenen wie Testosteron und DHT an den AR dieser aktiviert und bindet an androgenresponsive Zielgene im Zellkern androgenresponsiver Zielgewebe [7],[10],[45]. Bei Mutationen des AR-Gens kann es aufgrund der Hemizygotie zu einer direkten Auswirkung auf die männliche Geschlechtsdifferenzierung kommen, die entweder als Neumutation oder durch einen X-chromosomal-rezessiven-Erbgang durch heterozygote Mütter, ohne selbst betroffen zu sein, auftreten [44]. AIS ist als

Androgenrezeptordysfunktion charakterisiert durch eine verminderte oder fehlende intrazelluläre Androgenwirkung bei regelrechter Androgenproduktion. Als Resultat dieser hormonellen Resistenz kommt es zu einer verminderten Virilisierung des inneren und äußeren Genitals bei 46,XY Individuen [7], [46]. Die klinische AIS-Einteilung erfolgt in das komplette AIS (CAIS), das partielle (PAIS) und das milde AIS (MAIS) [40]. Ein CAIS präsentiert sich mit äußerlich weiblichem Genital und einer primären Amenorrhöe bei einer verkürzten Vagina, bei Abwesenheit der Gebärmutter und der Zervix aufgrund bestehender AMH-Ausschüttung und Anwesenheit der Hoden, die sich inguinal oder ektop befinden können. CAIS-Frauen zeigen während der Pubertät und als junge Erwachsene Testosteronwerte entsprechend den männlichen Referenzbereich und erhöhte LH-Werte. In der Pubertät kommt es durch Aromatisierung von Androgenen zu einer regelrechten weiblichen Brustentwicklung [40],[47]. Das klinische Spektrum des PAIS reicht von „weitgehend weibliches Geschlecht“ bis „männliches Geschlecht“. Charakteristisch für diese Patienten sind ein Mikropenis, Hypospadie und ein bifides Skrotum mit oder ohne Kryptorchismus [48],[49]. Das MAIS geht mit einer altersgerechten männlichen Geschlechtsentwicklung einher, jedoch ist es mit Infertilität und Gynäkomastie im Jugendalter assoziiert [48]. Die Prävalenz von einem CAIS sowie einem PAIS beträgt etwa 2-5 Fällen von 100.000 Männern in der kaukasischen Bevölkerung, MAIS tritt hingegen viel seltener auf [50].

Die Klinik eines AIS hängt vor allem von der Restaktivität des AR ab, jedoch haben vorangegangene Arbeiten von Deeb et al. [51] und Holterhus et al. [52] gezeigt, dass identische Mutationen im AR-Gen sich als unterschiedliche Phänotypen -auch innerhalb einer Familie - manifestieren können. Ursächlich für diese Variabilität kann das seltene Auftreten von AR-Mutationen als Mosaik sein [53], aber auch Störfaktoren wie ein 5 α -Reduktase Mangel sind möglich; in einer Arbeit von Jukier et al. [54] wurden bei zwei von drei Geschwistern mit AIS auch sekundär eine 5 α -Reduktase Defizienz festgestellt. Beide zeigten eine stärkere Beeinträchtigung des AIS-Phänotyps als das eine Geschwisterkind. Eine weitere Erklärung für die klinische Variabilität von AIS ist die Oligomutation: Mutationen in mehreren an DSD beteiligten Genen, die sich zusammen als einen einzigartigen Phänotypen zeigen können [55].

1.5.1 AIS Typ II und APOD-Assay

Im Gegensatz zu dem CAIS, welches zu 90-95% durch AR-Mutationen erklärbar ist, sind nur ein Drittel der Patienten mit einem klinischen PAIS tatsächlich mit einer AR-Mutation

assoziiert [56]. Hughes et al. [57] stellte einen Patienten mit CAIS vor: Nach der Entnahme von Genitalhautfibroblasten (GFs) zeigte sich in den Zellen keine Mutation im AR-Gen und eine regelrechte DHT-Bindekapazität an den AR sodass er davon ausging, dass mutierte Co-Faktoren des AR eine AIS-typische Klinik verursachen können. Diese Untersuchung berücksichtigte aber nicht die Messung der Transkriptionsaktivierung des AR, was jedoch später durch die Feststellung des Apolipoprotein D (APOD) als Zielgen für den AR in GFs möglich gemacht wurde [58]. Der APOD-Assay wurde in der Kieler AG Pädiatrische Endokrinologie entwickelt, da APOD sich als idealer Biomarker zur Überprüfung der zellulären Funktion des AR als Transkriptionsfaktors erwies [58].

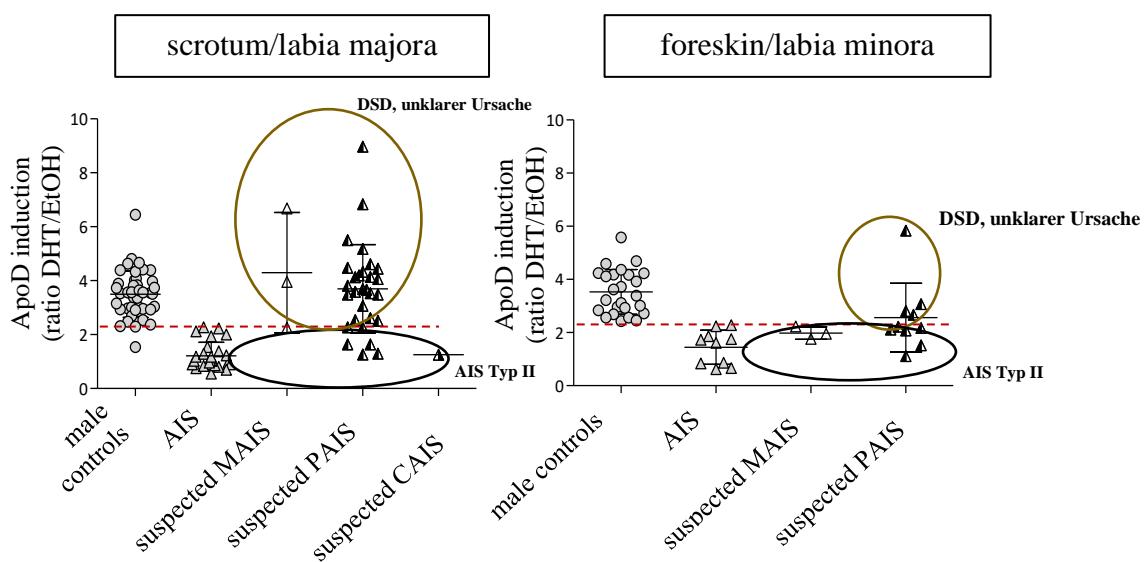


Abbildung 4: modifiziert nach Hornig et al. [10]. Dargestellt ist die Androgenaktivität mit Hilfe einer dihydrotestosteroninduzierten Transkriptionsaktivierung des APOD in GFs verschiedener Gruppen. Darunter die Kontrollgruppe, die Gruppe mit einer gesicherten Androgenresistenz (AIS) und die Gruppe mit klinischer Ausprägung eines AIS (suspected MAIS, suspected PAIS und suspected CAIS) ohne Mutation im AR-Gen. Die Cut-Off-Werte, um zwischen regelrechter und erniedrigter APOD-Induktion zu unterscheiden sind bei GFs aus der Vorhaut bzw. der Labia minora bei 2,36 und GFs aus der Skrotalhaut bzw. der Labia majora bei 2,29. EtOH: Ethanol, DHT: Dihydrotestosteron.

Die Arbeit von Appari et al. [58] führte zu der Arbeit von Hornig et al. [10], bei der die Androgenaktivität mit Hilfe einer DHT-induzierten Transkriptionsaktivierung des APOD-Gens in GFs von AR-Mutation-negativen Patienten mit einem klinischen Bild eines AIS an einem größeren Kollektiv gemessen wurde (siehe Abbildung 4). In dem APOD-Assay [10] werden die GFs mit DHT oder Ethanol inkubiert, wobei DHT als Ligand den AR aktiviert. Dort bindet er an seine Zielgene und veranlasst während der Embryogenese die männliche Entwicklung von äußeren und inneren Genitalien. In adulten ausdifferenzierten GFs konnte APOD als DHT-abhängiges AR-Zielgen identifiziert werden [58]. Einige Jahre später wurde

dieser Befund durch eine andere Arbeitsgruppe unabhängig bestätigt [59]. In dem APOD-Assay misst man nach 72h die Androgen-abhängige Expression von APOD im Vergleich zu den GFs, die nur mit Ethanol (Lösungsmittel für DHT als Negativkontrolle) inkubiert wurden und APOD Androgen-unabhängig synthetisierten. Die APOD-Induktion ist bei den unterschiedlichen Gruppen mit dem Entnahmehort der Fibroblasten angegeben (Abbildung 4). Die Cut-Off-Werte (rote gestrichelte Linie, siehe Abbildung 4) beziehen sich auf GF aus der Vorhaut bzw. der Labia minora (2,36) und der Skrotalhaut bzw. der Labia majora (2,29). In der Kontrollgruppe bestehend aus fertilen erwachsenen Männern mit Zustand nach Vasektomie und der Gruppe aus Kindern nach Orchidopexie ist eine regelrechte APOD-Induktion aufgrund eines funktionierenden AR zu erwarten (male controls). Bei Patienten mit einem gesicherten AIS durch Nachweis einer Mutation im AR liegt die APOD-Induktion unterhalb des Cut-Offs und weist nicht nur molekulargenetisch aber auch funktionell auf die Androgenresistenz hin (AIS). In der letzten Gruppe wurden Patienten untersucht mit einem Verdacht auf das AIS (suspected MAIS, suspected PAIS und suspected CAIS) bezogen auf die vorhandenen klinischen Daten wie Ausprägung der Virilisierungsstörung und regelrechter Androgenbiosynthese sofern basale und stimulierten Testosteronwerte (hCG-Test) angegeben waren. Die Patienten mit einer APOD-Induktion unterhalb des Cut-Offs werden als AIS Typ II aufgrund einer funktionellen Androgenresistenz definiert (siehe schwarze Umkreisung unterhalb des Cut-Offs) [10], da trotz Abwesenheit einer AR-Mutation der APOD-Assay eine Androgenrezeptordysfunktion aufzeigt. Das von unserer Arbeitsgruppe definierte AIS Typ II umfasst somit AR-mutationsnegative Patienten mit erniedrigter AR-Aktivität [10]. Ursächlich kann eine Hypermethylierung des AR-Promotors sein, aber auch Mutationen außerhalb der codierenden Regionen des AR-Gens sowie Co-Faktoren, die auf zellulärer Ebene in der Signalkaskade von Androgenen involviert sind [7]. Ein Großteil dieser Patienten mit einer klinischen Ausprägung eines AIS und ohne Mutation im AR zeigen bei der Untersuchung eine APOD-Induktion oberhalb des Cut-Offs. Diese werden für diese Arbeit als DSD unklarer Ursache definiert (braune Umkreisung der Probanden oberhalb des Cut-Offs) da der APOD-Assay auf eine regelrechte zelluläre Wirkungsvermittlung im AR hinweist und somit eine funktionelle Androgenresistenz ausgeschlossen werden kann. Für diese Arbeit wurden die letzten Gruppe aus Abbildung 4, die sich nach der Untersuchung mittels APOD-Assay in a.) AIS Typ II und b.) DSD unklarer Ursache gliedern für die Sequenzierung des *NR5A1*-Gens herangezogen. Bei 4 zusätzlichen Patienten mit einem Verdacht auf oder einer bewiesenen

Gonadendysgenesie wurde außerhalb der Arbeit von Hornig et al. [10] eine APOD-Assay Untersuchung durchgeführt und in dieser Arbeit auf eine *NR5A1*-Mutation sequenziert.

1.6 Fragestellung

In vorangegangenen Arbeiten [10] wurden GF von DSD-Patienten auf ihre AR-Funktion im APOD-Assay überprüft. Bei 78 Patienten ging man aufgrund des klinischen Verdachts von einem AIS aus; es fand sich abgesehen von einem Patienten mit einer AR-Mutation ohne schädigende Beeinträchtigung auf die Proteinstruktur (siehe S. 19, Tabelle 2 bei GF-322) keine AR-Gen-Mutation. Bei 4 weiteren DSD-Patienten ergibt sich der Verdacht auf eine Gonadendysgenesie unbekannter Ursache. Auch diese 4 Patienten wiesen keine AR-Gen-Mutation auf. Im APOD-Assay wies etwa ein Viertel (N=22) eine verminderte AR-Funktion (AIS Typ II) auf und drei Viertel (N=60) der Fälle eine normale AR-Funktion (DSD unklarer Ursache).

Aufgrund der sehr vielfältigen Pathomechanismen und des sehr breiten phänotypischen Spektrums könnte NR5A1 eine Rolle bei der Entwicklung von AIS Typ II spielen. Die weiter oben zitierten Fälle von NR5A1-mutationspositiven 46, XY DSD Patienten mit normwertigen bzw. hohen Androgenspiegeln [8], [9] könnten ein funktioneller Hinweis auf den Einfluss von SF-1 Mutation auf die Androgenwirkungsvermittlung sein. Dies wurde bislang nie untersucht.

In dieser Arbeit werden insgesamt 82 Patienten auf eine Mutation im *NR5A1*-Gen untersucht. Anhand der Kohorten (AIS Typ II und DSD unklarer Ursache) sollten 2 Fragestellungen beantwortet werden:

- Finden sich Mutationen im *NR5A1*-Gen bei Patienten mit einer nachgewiesenen funktionellen Androgenresistenz im APOD-Assay ohne AR-Genmutation (AIS Typ II) und welche Genotyp-Phänotyp-Korrelation findet sich?
- Wie häufig liegt bei Patienten mit DSD unklarer Genese und normaler AR-Funktion im APOD Assay eine *NR5A1*-Genmutation vor und welche Genotyp-Phänotyp-Korrelation findet sich?

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die Untersuchung von GFs von DSD-Patienten wurde unter Zustimmung der Ethikkomission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität in Kiel durchgeführt. Der Ethikantrag unter dem Aktenzeichen 415/11 sowie der Fortsetzungsantrag unter dem Aktenzeichen 401/14 sind genehmigt und sind im Anhang (S.60 und S. 61) aufgeführt. Alle GFs in der experimentellen Arbeit wurden doppelt verschlüsselt und nummeriert, sodass uns die persönlichen Daten hinsichtlich der Identität der Patienten unbekannt sind (Anonymisierung).

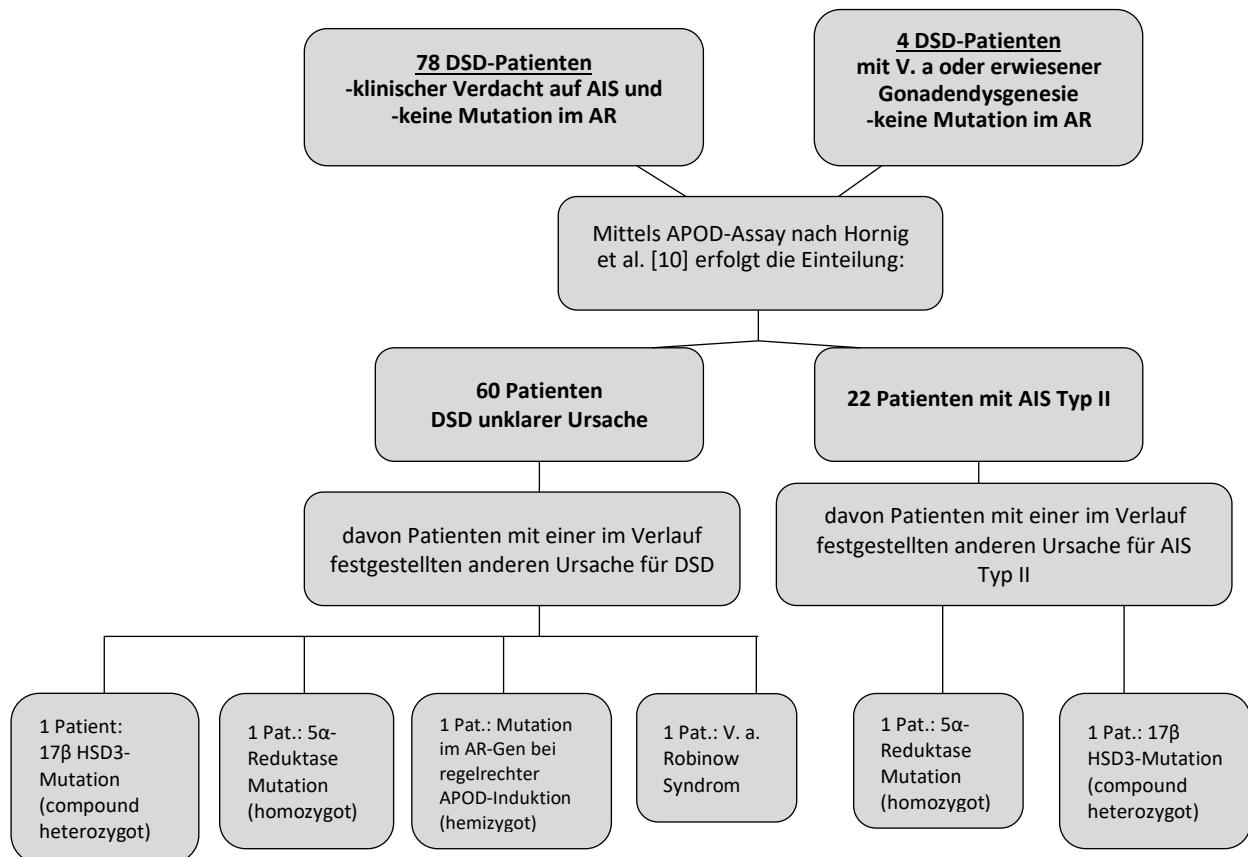


Abbildung 5: Zusammenfassung der Patienten, geordnet in die unterschiedlichen Patientenkohorten. Die Einteilung der 78 DSD-Patienten mit klinischem Verdacht auf AIS und ohne AR-Mutation aus einer vorangegangenen Arbeit von Hornig et al. [10] sowie 4 DSD-Patienten mit V.a oder erwiesener Gonadendysgenesie erfolgt mittels APOD-Assay. Nach Untersuchung ergaben sich 22 Patienten mit AIS Typ II bei Hinweis auf eine Störung der zellulären Wirkungsvermittlung im AR und 60 Patienten mit DSD unklarer Ursache ohne Androgenrezeptordysfunktion. Im Verlauf der Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe unter den 60 Patienten mit DSD unklarer Ursache 4 Patienten bzw. bei AIS Typ II Patienten 2 Patienten bekannt, die eine Mutation als eine Ursache oder eine Erkrankung (Verdacht auf Robinow-Syndrom) für ein DSD haben können.

2.2 Patientenkohorten

Insgesamt wurden 82 Patienten auf Mutationen im *NR5A1*- Gen untersucht. Bei jedem Patienten wurde ein Karyotyp 46,XY bestimmt. In dieser Arbeit sind per Sanger-Sequenzierung 67 Patienten untersucht wurden. Es erfolgte im Verlauf außerhalb der Doktorarbeit eine Next Generation Sequencing (NGS)-Analyse zur Untersuchung von 20 Patienten aus dieser Arbeit. 5 von diesen Patienten wurden zuerst in dieser Arbeit mittels Sanger Sequenzierung (Teil der N=67 Patienten) auf Mutationen im *NR5A1*-Gen untersucht und danach im Rahmen übergeordneter Arbeiten der AG Pädiatrische Endokrinologie in Kiel per NGS Exom sequenziert. Von diesen 5 Patienten sind zusammenfassend neben der in der Sanger Sequenzierung entstandenen Elektropherogramme der Exons 1-7 des *NR5A1*-Gens somit auch die Exom-Sequenzierung vorzufinden. Das bedeutet, dass ich 67 der 82 Patienten selbst experimentell per Sanger-Sequenzierung analysiert habe. Die NGS-Daten von 15 zusätzlichen Patienten durfte ich zusätzlich für diese Arbeit verwenden. Tabellen 1 und 2 auf S. 17 und S. 19 zeigen eine Übersicht über alle untersuchten Patienten eingeteilt in Patienten mit AIS Typ II und Patienten mit DSD unklarer Ursache. Details wie Klinik, basaler Testosteron- und stimulierter Testosteronwert, weitere Diagnosen der Patienten und bekannte Mutation sind darin zusammengefasst. In der vorangegangenen Arbeit mit dem Titel „*Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity*“ von Hornig et al. [10] wurde unter anderem die Gruppe bestehend aus DSD-Patienten mit klinischem Verdacht auf ein AIS ohne Mutation im AR-Gen mittels APOD-Assay untersucht (Abbildung 4, S. 10). Dieselbe Gruppe wird auch in dieser Arbeit, diesmal auf eine Mutation im *NR5A1*-Gen untersucht und macht die Mehrheit (n=78) aus. (Patientenkohorten sind in Abbildung 5 auf S. 14 zu sehen). Es wurden zusätzlich 4 Patienten mit einem Verdacht auf oder einer nachgewiesenen Gonadendysgenesie (z.B durch eine Miktionzystourethrogrammie (MCU) oder erniedrigter Testosteronwerte basal und stimuliert), unklarer Ursache miteinbezogen aufgrund der in der Literatur beschriebenen Assoziation mit einer *NR5A1*-Mutation [5], [17]. Der AR dieser Patienten wurde auch im Rahmen der Forschung der AG Pädiatrische Endokrinologie in Kiel mittels APOD-Assay untersucht. Aus den insgesamt 82 Patienten haben 22 Patienten die Diagnose AIS Typ II aufgrund eines pathologischen APOD-Assays (Bei einer APOD-Induktion unter dem Cut-Off-Wert von 2,36 bei Biopsien aus der Vorhaut bzw. aus der Labia minora und 2,29 aus Biopsien aus der Skrotalhaut bzw. der Labia majora.). Die 60 restlichen Patienten wurden als DSD unklarer Ursache definiert: Das sind jene Patienten bei denen eine regelrechte APOD-Induktion gemessen wurde, somit eine funktionelle Androgenresistenz ausgeschlossen wurde und die

Ursache der DSD weiterhin unklar ist. Wichtig ist, dass in beiden Kohorten bei insgesamt 6 Patienten bereits bekannte Mutationen in anderen Genen vorbeschrieben waren, was jedoch erst im Zeitraum dieser Doktorarbeit bekannt wurde. Die Patienten wurden dennoch in der Arbeit belassen, da zunehmend DSD-Patienten beschrieben wurden, die in mehreren Genen gleichzeitig pathogene Veränderungen aufwiesen [51],[55]. Es handelt sich bei den 6 Patienten um folgende Konstellationen: 2 Patienten haben eine nachgewiesene 5 α -Reduktase Defizienz und 2 Patienten eine nachgewiesene 17 β HSD3-Defizienz. Eine davon, GF-177, wurde in Bonn durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ulrich Schweitzer Exom-sequenziert festgestellt. Die Mutation ist in einem aktuellen Manuscript beschrieben, dass aber noch nicht publiziert ist.

1 Patient hat einen (nach den vorliegenden anonymisierten Unterlagen zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Dissertationsschrift nicht molekular bewiesenen) Verdacht auf das Robinow-Syndrom und 1 Patient hat eine Mutation im AR-Gen ohne schädigende Beeinträchtigung auf die Proteinstruktur (siehe Tabelle 2 bei GF-322). In vorangegangenen Arbeiten wurde dieser Patient bei Nachweis von streak Gonaden mittels Multigen Panel-Diagnostik untersucht und die AR-Mutation Asn366Lys wurde festgestellt. Der APOD-Assay nach Hornig et al. [10] zeigte eine regelrechte APOD-Induktion sodass eine funktionelle Resistenz des AR ausgeschlossen werden konnte und diese Mutation sehr wahrscheinlich nicht die Ursache des Phänotyps ist. Es wurde beschlossen, diesen Patienten aufgrund der Klinik auf eine Mutation im *NR5A1*-Gen zu untersuchen.

2.2.1 Klinische Beschreibung der Patienten

Um eine mögliche Korrelation zwischen der phänotypischen Entwicklung und einer *NR5A1*-Mutation mit und ohne AIS Typ II zu analysieren, wurde für diese Arbeit die Einteilung der genitalen Virilisierung nach Sinnecker et al. [60] (siehe Abbildung 6) verwendet.

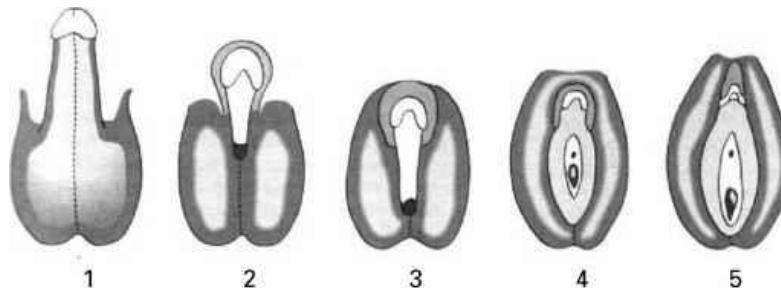


Abbildung 6: Klinische Einteilung der Virilisierung des äußeren Genitals nach Sinnecker et al. [60],[61]:
 1: männliche gestörte Spermatogenese, die mit einer gestörten Virilisierung in der Pubertät bei nahezu normaler äußerlicher männlicher Geschlechtsentwicklung vergesellschaftet sein kann
 2: höhergradige Hypospadien, Mikropenis, Skrotum bipartium
 3: „labienähnliches“ Skrotum, perineale Hypospadien, klitorisähnlicher Mikropenis
 4: Klitorishyperthrophie oder ein Sinus urogenitalis mit einer kurzen, blind endenden Vagina
 5: phänotypisch weibliches Geschlecht ohne Virilisierungszeichen

2.2.2 Übersicht aller Patienten- Tabelle 1 und 2

Patienten mit AIS Typ II	Alter	Testosteron		Klassifikat. n. Sinnecker et al. [60]	Mutation/ Diagnose/Bekannte weitere Befunde
		T basal nmol/l (mit jeweiligen Referenzbereich)	T nach hCG-Gabe nmol/l		
GF-196 (NGS)	-	-	-	n.a	-
GF-177 (NGS)	-	-	-	Keine eindeutige Klassifikation möglich Klinik: kuppelförmiges Scrotum	-
GF-116	15,11	6,58 (0,1-17,6) Normal bei p	-	4	-
GF-295 (NGS)	0,66	9,4 (0,1-0,4) unauffällig bei Minipubertät	-	3	-
GF-174 (Sanger-Seq. und NGS)	-	T ist altersentsprechend	T nach hCG-Gabe ist altersentsprechend	3	Minderwuchs, fehlende Sprachentwicklung
GF-252	15,57	<0,639 (0,1-17,6)	<0,639	5	-
GF-321	5,23	0,08 (0,1-0,9)	-	2	<u>Gonadendysgenesie</u>
GF-104 (NGS)	0,09	-	-	3	-
GF-162(NGS)	4,87	-	-	Keine eindeutige Klassifikation möglich Klinik: Penisdeviation li., Hypoplastisches corpora cavernosa Urethradivertikel, Blasendivertikel, Urethralklappe	-
GF-257	2,44	3,12 (0,1-0,7)	4,16	4	-
GF-105	5,32	-	-	3	Psychomotorische Entwicklungsstörung, Muskelhypotonie
GF-259 (Sanger-Seq. und NGS)	0,63	-	Kein T-Anstieg nach hCG-Gabe	3	<u>V.a Gonadendysgenesie</u>
GF-158(NGS)	9,6	0,48 (0,1- 5,6) Normal bei pp	-	2	-
GF-168(NGS)	10,07	13,17 (0,1-5,6) Normal bei p	-	4	-
GF-166(NGS)	0,07	-	-	3	-
GF-159(NGS)	11,31	0,16 (0,1-5,6) Normal bei pp	-	1-2	-
GF-172	1,68	1,2	Nach 1 Tag: 9,6 Nach 4 Tag: 24	4-5	-
GF-281	10,23	-	-	n.a	-
GF-161 (Sanger-Seq. und NGS)	0,28	0,048 (0,1-3,1)	-	4	-
GF-176	0,22	6,96 (0,5-12,6)	11,76	3	Minderwuchs, Ventrikelseptumdefekt
GF-175	0,98	12,16 (0,1-0,7)	-	4-5	SRD5A2-Mutation: p.Ile199Asn homozygot
GF-219(NGS)	4,71	0,138 (0,1-0,8)	15,25	2	17bHSD3-Mutation: (c.3G>A + c.278-1G>C compound heterozygot)

m:minipuberty, p: puberty, pp: prepuberty

Die Referenzbereiche für die Hormonwerte sind altersabhängig

T nach hCG-Gabe: Normbereich: Anstieg des Testosterons auf > 3,5 nmol/l bei präpubertären Jungen nach drei Tagen, 31,2nmol/l bei Erwachsenen nach drei Tagen
Referenz:

N. C. Hornig et al., "Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, no. 11, pp. 4468-4477, Nov. 2016

P.-M. Holterhus, M. B. (Tübingen) Ranke, and P.-E. (Bern) Mullis, *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*, 4th, revis ed. Karger, 2011.

C.-J. Partsch, P.-M. Holterhus, W. G. Sippell, and H. Mönig, *Endokrinologische Funktionsdiagnostik 6. überarbeitete Auflage*, 7. überarb. Kiel: Schmidt & Klaunig, 2011.

G. H. Sinnecker et al., "Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group," *Eur J Pediatr*, vol. 156, no. 1, pp. 7-14, 1997.

Tabelle 1: Alle 22 Patienten mit AIS Typ II bei einer erniedrigten APOD-Induktion (Cut-Off Wert: 2,29 bei Biopsien aus der Skrotalhaut bzw. der Labia majora und 2,36 bei GFs aus der Vorhaut bzw. der Labia minora).

Patienten mit einem DSD unklarer Ursache	Alter	Testosteron		Klassifikation nach Sinnecker et. al.[60]	Mutation/ Diagnose/Bekannte weitere Befunde
		Basal nmol/l (mit jeweiligen Referenzbereich)	T nach hCG-Gabe nmol/l		
GF-88	10,3	0,44 (0,1-0,6)	8,147	2	-
GF-285	5	-	-	n.a	-
GF-286	9	-	-	n.a	-
GF-255	-	-	-	4-5	-
GF-94	1,16	0,07 (0,1-0,7) Normal pp	n.a	3	-
GF-95	1,66	0,57 (0,1-0,7) normal pp	2,1	3	-
GF-267	0,05	-	-	3	-
GF-266	6,41	-	-	3	-
GF-278	-	-	-.	3	-
GF-86	31,67	Hoch normal	normal	1	-
GF-274	31,68	29 (12,1-35,7)	55,6	1	-
GF-222	0,3	2,32 (0,1-3,1)	4,26	3	Cerebrales Anfallsleiden mit psychomotorischer Retardierung, Balkenatresie
GF-279	3,87	0,20 (0,1-0,7)	4,78	3-4	-
GF-102	1,02	0,10 (0,1-0,7) Normal bei pp	3,04	3	-
GF-103	2,6	4,79 (0,1-0,7) Normal bei m	21,98	3	-
GF-272	-	-	-	1-2	-
GF-216 (Sanger-Seq. und NGS)	3	0,485 (0,1-0,7)	10,7	2-3	-
GF-277	-	-	-	Keine eindeutige Klassifikation möglich Klinik: kuppelförmiges Scrotum	
GF-273	-	T im Normbereich	-	3	-
GF-113	1,76	0,83 (0,1-0,7) Hoch normal bei pp	5,58	4	-
GF-108	0,46	-	-	3	V. a. Smith-Lemli-Opitz-Syndrom, art. Hypertonie, Leistenhernien, Hyperthyreose
GF-179 (Sanger-Seq. und NGS)	0,87	1,38 (0,1-0,4)	13,5	2	-
GF-256	2,36	-	-	3	-
GF-106	10,14	-	-	2	-
GF-110	11,14	3,18 (0,1-5,6) Normal in der frühen p	14,07 Normal in der frühen p	3	-
GF-111	0,05	2,39 (0,5-12,6) Normal bei m	-	3	Ichthiosis congenita
GF-112	2,58	0,01 (0,1-0,7) Normal bei pp	-	3	-
GF-261	0,09	-	-	2	-
GF-265	1,13	0,1 (0,1-0,7)	1,42	3	-
GF-263	0,11	-	-	5	-
GF-218	2,43	0,294 (0,1-0,7)	17,9	3	-
GF-262	24,125	0,75	-	4-5	-
GF-264	0,26	-	-	3	-
GF-114	8,96	1,73 (0,1-0,8) Hochnormal bei pp	<0,69	2	-
GF-115	0,03	6,06 (0,5-12,6) Normal bei m	-	3	-
GF-165	18,83	0,52 (4-24)	-	3	-
GF-270	-	-	-	3	-
GF-169(NGS)	2,43	-	-	2	-
GF-87	1,46	-	-	2	-
GF-213	5,44	-	-	2	Zwischenkieferplasie, pseudomediane Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, Nasenknochenplasie, Hypotelorismus, Minderwuchs,
GF-167	11,55	0,017	4,04	1-2	-

		(0,1-5,6) Normal bei pp			
GF-97	1,44	0,17 (0,1-0,7) normal bei pp	10,4	3	-
GF-276	0,27	5,75 (0,1-3,1)	7,52	3	-
GF-280	2,93	-	-	n.a	-
GF-101	0,92	5,96 (0,1-0,7) Normal bei m	14,00 Normal bei m	3	-
GF-100	1	11,32 (Ref: 0,1-0,7) Normal bei m	-	n.a	-
GF-99	0,26	9,08 (0,1-3,1) Erhöht bei pp	-	n.a	
GF-98	0,63	9,77 (0,1-0,4) Normal bei m	20,48	3	-
GF-269	-	-	-	3	-
GF-283	1,98	-	-	5	-
GF-248(NGS)	14,58	1,73 (0,1-17,6)	-	2	-
GF-160	2,35	4,85 (0,1-0,7)	17,33	4	-
GF-109(NGS)	1,29	-	-	3	-
GF-107(NGS)	0,03	-	-	3	-
GF-157	12,08	-	-	2	-
GF-163(NGS)	0,5	1,73 (0,1-0,4) Normal bei m	-	3	-
GF-241	1,25	0,13 (0,1-0,7)	10,01	3	SRD5A2-Mutation: p.Arg227Gln homozygot
GF-117	16,42	-	-	4	17bHSD3-Mutation: compound heterozygot, noch nicht publiziert Nachgewiesen durch Schweitzer et al. in Bonn
GF-322	0,28	0,20 (0,1-3,1)	-	5	AR-Mutation: p.Asn366Lys (nicht pathogen wirkend auf die AR-Transkriptionsaktivierung, da APOD-Induktion (3,88- fach) regelrecht ist (Cut-Off-Wert bei 2,36)) <u>Gonadendysgenesie</u>
GF-318	0,20	7,28 (0,5-12,6)	29,92	2	V. a. Robinow-Syndrom <u>V. a Gonadendysgenesie</u>

m: minipuberty, p: puberty, pp:pubertal

Die Referenzbereiche für die Hormonwerte entsprechen dem Alter der Patienten.

T nach hCG-Gäbe: Normbereich: Anstieg des Testosterons auf > 3,5 nmol/l bei präpubertären Jungen nach drei Tagen, 31,2nmol/l bei Erwachsenen nach drei Tagen

Referenz:

N. C. Hornig et al., "Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, no. 11, pp. 4468-4477, Nov. 2016

P.-M. Holterhus, M. B. (Tübingen) Ranke, and P.-E. (Bern) Mullis, *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*, 4th, revis ed. Karger, 2011.

C.-J. Partsch, P.-M. Holterhus, W. G. Sippell, and H. Möning, *Endokrinologische Funktionsdiagnostik 6. überarbeitete Auflage*, 7. überarb. Kiel: Schmidt & Klaunig, 2011.

G. H. Sinnecker et al., "Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group," *Eur J Pediatr*, vol. 156, no. 1, pp. 7-14, 1997.

Tabelle 2: Alle 60 Patienten mit DSD unklarer Ursache bei einer regelrechten APOD-Induktion (Cut-Off Wert: 2,29 bei Biopsien aus der Skrotalhaut bzw. der Labia majora und 2,36 bei GFs aus der Vorhaut bzw. der Labia minora).

Material

2.2.3 Geräte und Arbeitsinstrumente

Gerät/Arbeitsinstrument	Firma
Pipetten	Research plus, Eppendorf, Hamburg
Spektralphotometer	Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham
PCR-Cycler	Arktik, Thermo Scientific, Waltham
	Mastercycler, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg Galaxy Mini, VWR International, Darmstadt
Schüttler	Vortex-Genie 2, Scientific Industries, New York Polzin Reax 2000, Heidolph, Schwabach
Spannungsquelle	EPS 601, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont
Elektrophoresekammer	Whatman, Biometra, Göttingen
UV-Dokumentationsanlage	DeVision DBOX, Deacon DC
Sequenzierer	3130 Genetic Analyser, AB Hitachi, Foster City
Vakuum	+Merck Millipore, Burlington
Kleinschüttler	MS3 basic, IKA, Staufen
Waage	1205, Sartorius, Hamburg

2.2.4 Chemikalien und Kits

Chemikalie/Kit	Firma
DNA-Polymerase Kit	HotStarTaq DNA Polymerase, Qiagen, Hilden Platinum TM PCR SuperMix High Fidelity, Thermo Scientific, Waltham
Agarose	Agarose, Invitrogen, Darmstadt
TAE-Puffer (484g Tris Base 154,2ml Essigsäure 200ml EDTA 0,5M auffüllen auf 2L Aqua dest.)	
Ethidiumbromid	10 mg/ml Ethidiumbromidlösung, Roth, Karlsruhe
Loading Dye	Loading Dye 5x, Gel Pilot, Qiagen, Hilden
DNA-Längenmarker	1kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Waltham
Cycle Sequencing Kit	BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Quiagen, Hilden
Infusionslösung	Injection Solution, Merck Millipore, Burlington

2.2.5 Verbrauchsartikel

Verbrauchsartikel	Firma
Pipettenspitzen	Biosphere Filter Tips, Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzefäße	
Wellplatten	MinElute 96 PCR-Purification Platte, Qiagen, Hilden, Montage SEQ96 Sequencing Reaction Clean Up Kit Thermofast 96 PCR Detection Plate, Thermo Scientific, Waltham

Primer

Biomers, Ulm

NR5A1 Exon 1	forward	5'-ACC GGT CAC TAA GTG GAG CA-3'
	reverse	5'-CAC TGG CCT GTC CTG ACT CT-3'

Metabion, Martinsried

NR5A1 Exon 2_3	forward	5'-GGG CAC AGA GAG GGG ATT AC-3'
	reverse	5'-GGC CAA TGG TAC TAT CCC CT-3'
NR5A1 Exon 4_1	forward	5'-GGG GCT TAG AGA GGG TGA GT-3'
	reverse	5'-GCT CCG GGT ACT CAG ACT TG-3'
NR5A1 Exon 4_2	forward	5'-CCA CTG GCT GGC TAC CTC TA-3'
	reverse	5'-GGG AGG ACC ATG ATG CAG-3'
NR5A1 Exon 5	forward	5'-ATC TGG GTA GAT GGG CAC AG-3'
	reverse	5'-TGA ATC CTG GAA GTG CAC AG-3'
NR5A1 Exon 6	forward	5'-GAC CCA CGT CCT CTG ACT GT-3'
	reverse	5'-TAA GGG AGG GGT CCT TTC TC-3'
NR5A1 Exon 7	forward	5'-TGG TAT TGG TGA TGC TGG TG-3'
	reverse	5'-CTC GGT GGG CAT CAG AAA-3'

Verdünnung der Primer

Die Primer wurden jeweils zu 200pmol/µl verdünnt und bei -20°C eingefroren. Eine 1:10 verdünnte Arbeitslösung wurde bei 4°C gelagert.

2.3 Methoden- Durchführung der molekularen Untersuchungen

Es werden im Folgenden die experimentellen Einzelschritte für die Sequenzierung des *NR5A1*-Gens mittels der Sanger-Sequenzierung beschrieben, die bei den 67 von 82 Patienten angewendet wurden.

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Segmente und ermöglicht die selektive Vervielfältigung einer DNA-Matrize. Die Schritte einer PCR bestehen aus der Denaturierung, Annealing und der DNA-Synthese (Elongation) [62]. Beim ersten Schritt wird

die DNA-Matrize in Einzelstränge aufgetrennt und danach lagern sich bei der Annealing-Phase die Primer an ihren komplementären Bereich des jeweiligen entstandenen DNA-Einzelstranges an. Im letzten Schritt werden mit Hilfe der DNA-Polymerase und dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) die Primer verlängert. Danach wiederholt sich dieser Zyklus mehrere Male, um die gewünschte Sequenz zu vervielfältigen [63].

2.3.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

Bei allen aufgelisteten *NR5A1*-Primerpaaren musste die Temperatur bestimmt werden, bei der sich die Primer an die einzelsträngige DNA anlagern (Annealing), sodass nur ein spezifisches PCR-Produkt entsteht. Es wurden bei der PCR zunächst die Annealing Temperaturen von 55,5°C, 60°C und dann 58,5°C gewählt. Es wurde auch die Taq DNA-Polymerase High Fidelity mittels PCR getestet. Anschließend konnten die PCR-Produkte mithilfe der Gelelektrophorese sichtbar gemacht und ausgewertet werden. Gegebenenfalls wurde die Annealing-Temperatur oder die Polymerase verändert, um optimale Bedingungen zu schaffen.

2.3.3 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Die Patienten-DNA wurde auf eine einheitliche Konzentration von 100ng/µl verdünnt und bei -4°C gelagert. Für die PCR wurde ein Ansatz mit einem Volumen von 25µl pro Probe hergestellt und dann im Arctic Cycler mit folgendem Programm gestartet:

Temperatur	Min.
95°C	15:00
94°C	1:00
58,5°C	1:00
72°C	1:00
72°C	10:00

35x

2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Durch Wanderung im elektrischen Feld können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und bestimmt werden. Zur Herstellung eines 1-prozentigen Gels wird zu 1g Agarose 100ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt und etwa 3 Minuten in der Mikrowelle aufgelöst. Anschließend wird die Lösung abgekühlt bis die Lösung etwa lauwarm ist, dann 3µl Ethidiumbromid hinzugefügt und schließlich wird die Lösung in den Gelträger gegossen und

dann zum Härten stehen gelassen.

Zu den 5 μ l PCR-Produkten wird 1 μ l 6x Gel Loading Dye hinzugefügt und dann in die Taschen des Gels pipettiert. In die erste Tasche wird der DNA-Längenmarker (1kb Plus DNA Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 120V zwischen 30 und 35 Minuten durchgeführt. Im Anschluss werden die entstandenen Banden mittels Kamera unter UV-Licht mit dem Programm *DeVision G* dokumentiert. Ein Bild zu den Banden der jeweiligen Exons des SF1 in der Agarose-Gelelektrophorese sind im Anhang zu finden.

2.3.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung wurden die PCR Produkte mit 40 μ l Aqua dest. versetzt und dann auf 96-Well Titerplatten (MinElute 96 PCR Purification Platten, Qiagen) überführt. Die Wellplatte wurde auf einen Halter der Vakuumpumpe platziert und ein Druck von 20-25mmHg angelegt und gewartet, bis das Vakuum die Lösung komplett durch die Membran der Platte gesaugt hat. Danach wurde in jedes Well 50 μ l Aqua dest. zum Waschen hinzugefügt, das Vakuum angelegt und wieder gewartet bis die Flüssigkeit komplett durch die Membran gesaugt wurde. Anschließend wurde in jedes Well 20 μ l Aqua dest. pipettiert und nach Abdeckung der Platten bei 1500 U/min für 5 Minuten geschüttelt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden dann in ein 0,2ml Gefäß überführt.

2.3.6 Sanger-Sequenzierung

In dieser Arbeit wird mithilfe der Sanger-Sequenzierung die Basenabfolge der Exons des *NR5A1* auf der Basis der in-vitro-Replikation entschlüsselt.

Die DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. [64] wird auch als Kettenabbruchmethode oder Didesoxynucleotidverfahren bezeichnet. Zuerst werden in der Denaturierungsphase die Wasserstoffbrücken der DNA aufgebrochen, um je zwei Einzelstränge zu erhalten.

Der Primer hybridisiert an einem der DNA-Stränge, davon ausgehend verlängert die DNAPolymerase den komplementären DNA-Strang.

Es befinden sich in diesem Verfahren neben den dNTPs auch die 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche auch je ddNTP eine der vier in der DNA vorkommenden Basen Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin enthalten. Beide dienen als Substrate für die Kettenverlängerung, wobei die ddNTPs keine 3'-Hydroxygruppe besitzen. Wird ein ddNTP eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch, denn aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Es ergeben sich

unterschiedlich lange DNA-Produkte, da die dNTPS mit den ddNTPS um die Stellen konkurrieren [62]. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die in jedem Ansatz stets mit dem gleichen ddNTP enden. Dieses Verfahren kann durch das sogenannte „Cycle Sequencing“ öfters hintereinander ablaufen, wobei wie bei der PCR Phasen der Denaturierung, Annealing und Elongation bei unterschiedlichen Temperaturen durchlaufen werden und schließlich unterschiedlich lange DNA-Produkte mit jeweils einem ddNTP am Ende entstehen [65].

Mittels fluoreszenzmarkierter ddNTPs, bei der die Basen A, G, C und T mit unterschiedlichen Fluorophoren am Ende der unterschiedlich langen DNA-Fragmente markiert und detektiert werden können, kann die Basenabfolge festgestellt werden [66],[67]. Dabei erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente die Anregung der Fluorophore über Laserstrahlen. Ein Detektor registriert die Strahlung dieser Fluoreszenz als verschiedene Wellenlängen, die wir als unterschiedliche Farben wahrnehmen [67]. In einem Elektropherogramm werden die verarbeiteten Daten als ermittelte Sequenz veranschaulicht. Zu sehen ist eine Abfolge von Farbsignalen in Form eines Peak-Verlaufs auf einer Basislinie, die direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wiedergibt.

2.3.7 Durchführung

Für die Sequenzierungsreaktion wurde das BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Zu dem 18 µl Mastermix wurde je 2 µl PCR-Produkt hinzugefügt.

Die Bestandteile des Master-Mix sind im Anhang aufgelistet.

Wenn bei der Elektrophorese eine DNA-Bande ein schwaches Signal aufwies, wurde für den Mastermix mehr PCR-Produkt hinzugefügt und die Menge Aqua dest. dementsprechend reduziert. Das für das Cycle-Sequencing entsprechende MasterCycler Programm ist im Anhang aufgeführt.

2.3.8 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Für diesen Schritt wurde das Montage SEQ96 Sequencing Reaction Clean Up Kit verwendet. Das Produkt der Sequenzierungsreaktion wurde mit 20 µl der zum Kit gehörenden Injektionslösung gemischt und dann auf die 96 Well-Filterplatte überführt. Es wurde ein Vakuum von 20-25 mmHg angelegt und abgewartet, bis die Flüssigkeit vollständig durch die Membran gesaugt worden war. Anschließend wurde das Produkt durch das Hinzufügen von weiteren 20 µl Injektionslösung gewaschen und ein Vakuum angelegt, bis die Flüssigkeit

dadurch entfernt wurde. Dann wurden 20 µl Aqua dest. in jedes benutzte Well pipettiert, die Platte abgedeckt und für 5 Minuten bei 1500 U/min geschüttelt.

2.3.9 **Ablauf am Sequenzierer**

Zu 5 µl gereinigtem Sequenzierungsprodukt wurden 30 µl Aqua dest. hinzugefügt und auf die Sequenzierplatte überführt. Wenn die Sequenzierreaktion überladen war, wurde die Sequenzierung mit weniger Sequenzierprodukt wiederholt, bei zu geringem Signal entsprechend mehr Sequenzierprodukt eingesetzt.

2.4 Auswertung der DNA-Sequenzen

Für die Auswertung der Sequenzen wurde zuerst das Programm *Chromas* verwendet, mit dem die Qualität der Sequenzen überprüft und Mutationen ermittelt wurden. Zusätzlich wurden alle Sequenzierungen mithilfe des Programms *SecScape* von mindestens einer weiteren Person ausgewertet. Bei Entdeckung einer Mutation wurde diese durch eine zweite Sequenzierung validiert. Die Sequenzierung wurde außerdem wiederholt, wenn durch mangelnde Qualität keine Auswertung möglich war. Für die Auswertung wurden die Sequenzen zunächst gegen die menschliche Referenzsequenz des *NR5A1*-Gens abgeglichen. Mithilfe des Genom-Suchprogramms der Universität von Kalifornien Santa Cruz (UCSC) hat man einen Überblick über die Genome zahlreicher Spezies sowie der aktuell bekannten Mutationen (<https://genome.ucsc.edu>). Die Sequenzen der Patienten wurden mit der humanen Referenzsequenz des *NR5A1*-Gens im UCSC Browser verglichen, um pathogene sowie unbekannte Mutationen analysieren zu können. Die Anordnung Genome Reference Consortium Human Build 38 (GRCh38) wurde verwendet. Bekannte pathogene Mutationen wurden online in der Mutationsdatenbank Human Gene Mutation Database (HGMD) eingegeben, um Publikationen zu den Mutationen zu finden. Zusätzlich wurden die Mutationen auch in PubMed des „National Center for Biotechnology Centers“ (NCBI) recherchiert, indem der Suchbegriff „SF-1“ oder „*NR5A1*“ eingegeben wurde. Um sicher zu gehen, dass unbekannte Mutationen nicht annotiert waren, wurde eine zweite Datenbank, die gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), verwendet. Wenn die Mutation auch dort nicht beschrieben wurde, wurde mit Hilfe von Prädiktionsprogrammen die Pathogenität der Mutationen berechnet. Das Vorgehen bei jeder Sequenz ist in Abbildung 7 gezeigt. Mithilfe des „Sorting intolerant from tolerant“ (SIFT)-Scores und des Polyphen-Scores ist es möglich, erste Einschätzungen über die Mutationen machen zu können, basierend auf Faktoren wie der Konservierung, der Position in der Sequenz sowie physikalischer Eigenschaften der Aminosäuren [68],[69]. Beide Scores geben Hinweise darauf, ob eine Mutation eine schädigende Auswirkung auf das Protein haben kann. Ein Score zwischen 0 und 0,05 weist auf einen schädigenden Effekt der Mutation bei dem SIFT-Score hin; zwischen 0,05 und 1 wird die Variante als Mutation ohne schwerwiegende Konsequenzen eingestuft. Beim Polyphen-Score verhält es sich genau anders herum: Scores über 0,446 und 1 sind als „möglicherweise schädigend“ anzusehen, während Scores zwischen 0,445 und 0 auf eine gutartige Mutation hinweisen. Die Scores wurden auf der Seite ensembl.org mithilfe des Ensembl Variant Effect Predictor [70] berechnet.

Ein aktuelleres und umfangreicheres Prädiktionsprogramm ist das sogenannte „Combined

Annotation Dependent Depletion“ (CADD)- Berechnungssystem. Es vereint verschiedene Annotationen aus Daten zur Konservierung, Genregulation, Transkription und Algorithmen wie SIFT und Polyphen zu einem Score für die Abschätzung der relativen Pathogenität von Punktmutationen oder kleinerer Indels [71]. Für die Berechnung des CADD Algorithmus wurden Daten aus 14,7 Millionen Allelen mit 8,6 Milliarden möglichen Varianten des ENCODE-Projekts [72] berücksichtigt. Es wurden Informationen zu Funktionalität, Pathogenität, Schweregrad der Erkrankung und der experimentell ermittelten regulatorischen Effekte in dem Algorithmus miteinbezogen, mit Hilfe dessen der CADD-Score die Pathogenität der Variante ermittelt [71]. Ein höherer Score, deutet auf eine schwerwiegendere Mutation hin: Ein CADD-Score über 20 weist auf eine Pathogenität der Variante hin [71]. Für die Darstellung der Mutationen wurde das Web-Programm Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org>) von der Universität in Basel gewählt. Mit diesem Prädiktionsprogramm ist es möglich, 3D Proteinstrukturen zu modellieren, unterschiedlich darzustellen und Unterschiede der Strukturen auf physikalischer und chemischer Ebene feststellen zu können. In das Programm wurde der Proteinbereich der Mutation mit dem entsprechenden Bereich im Wildtyp verglichen. Da nicht das ganze Protein in diesen 3D-Modellen dargestellt wurde, sondern die Abschnitte mit der Lokalisation der Mutation dargestellt wurden, kann keine Aussage über eine ausgeprägte Veränderung der gesamten Proteinstruktur gemacht werden bzw. ob Protein-Protein-Interaktionen durch die Mutation beeinträchtigt wurden.

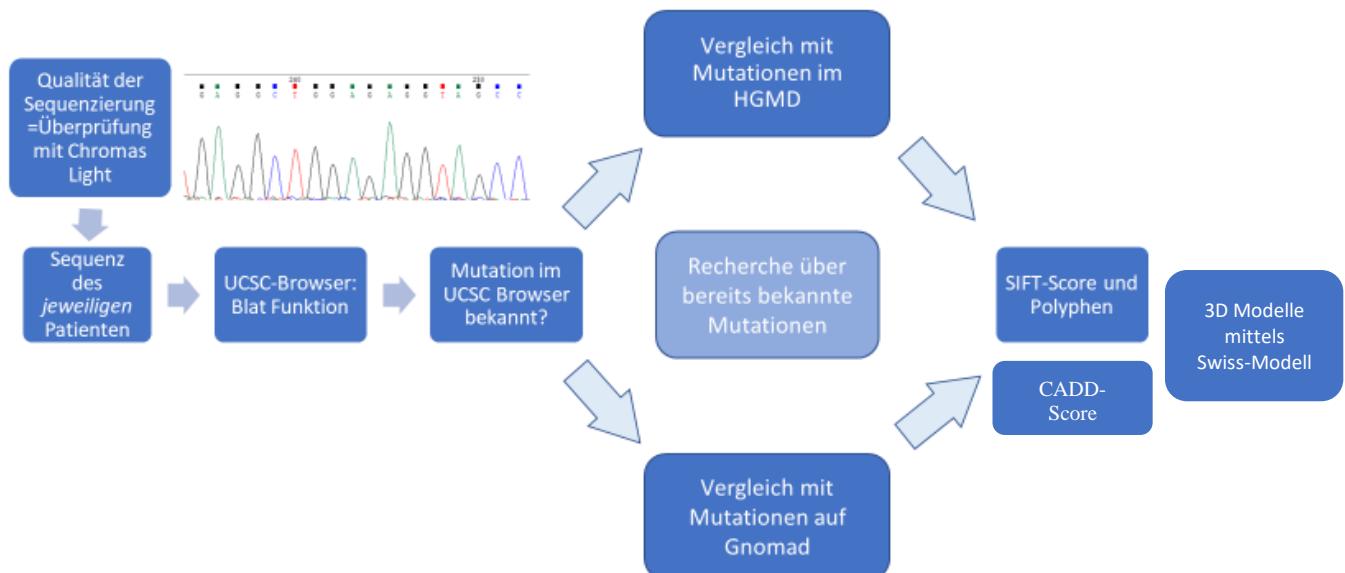


Abbildung 7: Ablauf der Auswertung der experimentellen Doktorarbeit beginnend mit der Überprüfung der Sequenz, Vergleich der Sequenz mit der Referenzsequenz, Recherche über weitere bekannte Mutationen in mehreren Datenbanken (HGMD, NCBI, gnomAD) sowie Berechnung des SIFT- und Polyphen-Scores für die Einschätzung der Pathogenität. Im Programm Swiss-Model wurde eine mögliche Strukturveränderung modelliert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierte Mutationen im *NR5A1* Gen, Übersicht

Nach Sequenzierung und Auswertung wurden 7 möglicherweise pathogene Mutationen identifiziert (Tabelle 3, S. 29) Insgesamt wurden 67 Patienten per Sanger-Sequenzierung und 15 Patienten mittels NGS aus 82 DSD-Patienten auf eine Mutation im *NR5A1*-Gen untersucht: 78 mit ursprünglich klinischem Verdacht auf AIS aus der Arbeit von Hornig et al. [10] und 4 mit einem Verdacht auf eine Gonadendysgenesie. Nach der Untersuchung der AR-Funktion mittels APOD-Assay nach Hornig et al. [10] erfolgt die Einteilung in Patienten mit AIS Typ II und Patienten mit DSD unklarer Ursache.

Von 22 Patienten mit AIS Typ II wurden drei Patienten (13,6%, Fragestellung 1) mit heterozygoten Mutationen im *NR5A1*-Gen festgestellt: GF-161 mit Pro205Hisf und Ser203Arg, GF-259 mit Asn44del und GF-257 mit Glu330Asp. Diese Patienten haben zusätzlich zu der funktionellen AR-Resistenz somit eine bzw. zwei nachgewiesene *NR5A1*-Mutation.

Patienten GF-264 mit Arg39His und GF-114 mit Gly26Stopp als Mutation im *NR5A1*-Gen gehören zu der Patientenkollektiv bestehend aus 60 Patienten mit der Diagnose DSD unklarer Ursache, da der APOD-Assay eine funktionelle AR-Resistenz bei regelrechter APOD-Induktion (APOD-Induktion oberhalb des Cut-Offs) ausschloss.

Patient GF-318 mit dem Verdacht auf ein Robinow-Syndrom zeigte eine Mutation im im Promotorbereich bei ebenso regelrechter APOD-Induktion. Da sich die Mutation des Patienten GF-318 im Intron Bereich befindet, konnte keine Voraussage der Schädigung mithilfe der Scores gemacht werden. Letztlich wurden bei 3 von 60 Patienten mit der Diagnose DSD unklarer Genese Mutationen im *NR5A1*-Gen gefunden (5%, Fragestellung 2).

Abgesehen von der Mutation Asn44del bei GF-259 aus der Gruppe der AIS Typ II Patienten, die erstmals von Yu et al. [73] festgestellt wurde, ist bisher jede der hier gefundenen *NR5A1*-Mutationen zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Dissertationsschrift nicht in der Literatur beschrieben worden. Im Anhang sind die Mutationen auf unterschiedlichen Exons des *NR5A1*-Gens zusammenfassend abgebildet (Abbildung 11, S.56).

Patient	AIS Typ II/ DSD unklarer Ursache	Alter bei Biopsie	DHT-abhängige APOD-Induktion des AR-Zielgens ohne Serumentzug	Lokalisation	Mutation	Laborwerte (T, LH, FSH)	SIFT-Score Polypyphen & CADD-Score	Referenz [Literatur]	Klassifikation nach Sinnecker et al.[60]
GF-161	AIS Typ II	0,28	2,05	Exon 4	p.Ser203Arg (c.608G>C), p.Pro205Hisfs*91	T: 0,048nmol/l (Ref: 0,1-3,1 nmol/l)	p.Ser203Arg: CADD: 18 SIFT: 0,04 (deleterious) Polypyphen: 0,374(benign) Pro205Hisfs*91: LOF	bisher nicht beschrieben	4
GF-257	AIS Typ II	2,44	2,13	Exon 5	p.Glu330Asp (c.1187G>T)	T: 3,1nmol/l (Ref: 0,1-0,7nmol/l) LH: 13,8 IU/l (Ref: <0,6/2,7 IU/l) FSH: 17,3 IU/l (Ref: <1,0-4,4IU/l)	CADD: 32	bisher nicht beschrieben	4
GF-259	AIS Typ II	0,63	1,46	Exon 3	p.Asn44del (c.132-134delCAA)	T nicht stimulierbar	CADD: 27	Yu et al. 2018 [73]	3
GF-264	DSD unklarer Ursache	0,26	6,13	Exon 3	p.Arg39His (c.116G>A)	-	0 (deleterious)/ 0,993 (probably damaging) CADD: 28,9	bisher nicht beschrieben	2-3
GF-114	DSD unklarer Ursache	8	6,94	Exon 2	p.Gly26Stop (c.76G>T)	T: 0,17 nmol/l (Ref: 0,1-0,8nmol/l) nicht stimulierbar nach hCG-Provokation mit 5000 IE hCG/m ²	LOF	bisher nicht beschrieben	2
GF-318	Verdacht auf Robinow Syndrom	0,20	4,67	Promotorbereich	chr9:124,507,228 T>A:Intrinsicher Bereich	T: 7,28nmol/l (Ref: 0,5-12,6nmol/l) nach hCG-Provokation von 600 IE hCG/m ² nach 3 Tagen: 23,92 nmol/l	SIFT-Score Polypyphen & CADD-Score aufgrund Lokalisation im Intronbereich nicht möglich	bisher nicht beschrieben	2

Abkürzungen: DHT: Dihydrotestosteron, hCG: humanes Choriongonadotropin, LOF: Loss of function, T: Testosteron; LH: Luteinisierendes Hormon

Die DHT-abhängige, AR-induzierte APOD-mRNA Expression repräsentiert das Verhältnis zwischen DHT- und Ethanol(EtOH)-behandelten GFs im APOD-Assay

Referenzwerte beziehen sich auf das jeweilige Alter. Normbereich bei Anstieg des Testosterons nach hCG-Gabe: > 3,5 nmol/l bei präpubertären Jungen nach drei Tagen, 31,2nmol/l bei Erwachsenen nach drei Tagen

Referenz:

N. C. Hornig et al., "Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, no. 11, pp. 4468-4477, Nov. 2016

P.-M. Holterhus, M. B. (Tübingen) Ranke, and P.-E. (Bern) Mullis, *Diagnostics of Endocrine Function in Children and Adolescents*, 4th, revis ed. Karger, 2011.

C.-J. Partsch, P.-M. Holterhus, W. G. Sippell, and H. Mönig, *Endokrinologische Funktionsdiagnostik 6. überarbeitete Auflage*, 7. überarb. Kiel: Schmidt & Klaunig, 2011.

G. H. Sinnecker et al., "Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group," *Eur J Pediatr*, vol. 156, no. 1, pp. 7-14, 1997.

Tabelle 3: Übersicht der 7 NR5A1-Mutationen, die mittels Sanger Sequenzierung festgestellt worden sind. Außerhalb dieser Arbeit wurde zusätzlich Exom-Sequenzierung von den hier gelisteten Patienten GF-161 und GF-259 per NGS durchgeführt.

3.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelation der SF-1 Mutations-positiven Patienten

Es werden im Folgenden die Klinik, der Virilisierungsgrad nach Sinnecker et al. [60] sowie die Hormonwerte Testosteron, FSH, LH und DHT sofern vorhanden, der jeweiligen *NR5A1*-Mutations-positiven Patienten angegeben. Die Befunde wurden aus den anonymisierten Arztbriefen entnommen.

3.2.1 AIS Typ II-Patienten

Bei diesen Patienten wurde neben der im APOD-Assay nach Hornig et al. [10] festgestellten funktionellen Androgenresistenz zusätzlich eine bzw. zwei *NR5A1*-Mutationen durch Sanger-Sequenzierung entdeckt. Bei Patient GF-161 und Patient-257 ging man in vorherigen Arbeiten aufgrund der Klinik von einem AIS aus, bei Patient GF-259 hingegen weist der nicht vorhandene Testosteron-Anstieg nach hCG-Stimulation darauf hin, dass auch eine Hormonbiosynthesestörung oder eine Gonadendysgenesie ursächlich mit in Frage kommen könnten. Mutationen in Genen der Androgenbiosynthese sind bei GF-259 jedoch im Rahmen der Exom-Sequenzierung nicht gefunden worden.

3.2.1.1 Patient GF-161

Es wurde bei diesem phänotypisch weiblichen Patienten eine Missense-Mutation, Ser203Arg, sowie benachbart eine Frameshift-Mutation, Pro205Hisfs*91 auf dem Exon 4 entdeckt. Der Patient war 3,3 Monate alt zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Die APOD-Induktion war



Abbildung 6: Zur Verfügung gestellt von Dr Hornig. Ser203Arg und Pro205Hisfs*91 sind bei der Next-Generation-Sequencing-Analyse auf demselben Allel rot markiert. Zu Sehen sind die Missense-Mutation (Ser203Arg) bei der das G zu einem C wird und die Frameshift-Mutation (Pro205Hisfs*91) auf demselben Allel aufgrund des Verlusts eines G.

bei diesem Patienten 2,05-fach (Cut-Off-Wert: 2,29) und ist somit als AIS Typ II Patient definiert. Klinisch findet sich eine Klitorishypertrophie und diskret skrotal imponierende Labien mit einer im Arztbrief beschriebenen „ausgeprägten posterioren Fusion“. Die Hoden befinden sich beidseits inguinal. Bei einer MCU wurde die Öffnung unterhalb der phallusähnlichen Klitoris sondiert und der Katheter gelang in die Blase. Es wurde ein Sinus urogenitalis und eine normal weite Urethra, von der dorsal ein Gang nach dorsal abgeht und in der Position einer rudimentären Vagina liegt, nachgewiesen. Zusammenfassend zeigt sich ein Virilisierungsgrad 4 nach Sinnecker et al. [60]. Das Testosteron war mit 0,048nmol/l (Normbereich: 0,1-3,1 nmol/l) erniedrigt. Er gehört zu der Gruppe der Patienten mit klinischem V.a AIS und ohne AR-Mutation zu der Arbeit von Hornig et al. [10] in Abbildung 4. Diese Zuordnung trotz erniedrigtem Testosteronwert wird in der Diskussion näher betrachtet (siehe Kapitel 4.1.1.1). Das *NR5A1*-Gen des Patienten wurde zuerst mittels Sanger Sequenzierung untersucht, dabei wurden diese Mutationen festgestellt und dann wurde im Rahmen übergeordneter Arbeiten der AG Pädiatrische Endokrinologie in Kiel per NGS Exom-Sequenzierung durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die beiden Mutationen sich auf demselben Allel befinden (siehe Abbildung 6; Bild wurde von Dr. Hornig zur Verfügung gestellt).

3.2.1.2 Patient GF-257

Dieser Patient hat eine Missense-Mutation in Exon 5, die zu einer Veränderung der Aminosäure von Glutaminsäure zu Asparaginsäure führt und durch Sanger-Sequenzierung festgestellt wurde. Die Biopsieentnahme von GFs erfolgte im Alter von 2,4 Jahren aus der Labia majora. Der APOD-Wert von 2,13 liegt unter dem Cut-Off-Wert von 2,29 sodass dieser Patient eine funktionelle Androgenresistenz hat (AIS Typ II). Die Hoden, die sich zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme im Leistenkanal befanden, wurden operativ entfernt. Dieser Patient ist bezogen auf das äußere Genital phänotypisch überwiegend weiblich mit einem Genitalbefund 4 nach Sinnecker et al. [60]. Es findet sich eine Klitorishypertrophie (die später operativ korrigiert wurde), ein partieller Sinus urogenitalis und eine Vaginalanlage. Die Cysturethrogrammie zeigte eine Harnblase ohne Auffälligkeiten. Der Hormonbefund zeigte basal ein erhöhtes Testosteron mit 3,1 nmol/l (Normbereich: 0,1-0,7 nmol/l) und 4,2 nmol/l 48h nach Stimulation mit 1.000 IE hCG. Ein auffällig erhöhter basaler FSH Wert von 17,3 IU/L (Normbereich: <0,5-2,2 IU/L) sowie ein erhöhter LH-Wert von 13,8 IU/L (Normbereich: <0,3-2,5 IU/L) waren angegeben.

3.2.1.3 Patient GF-259

Bei diesem Patienten wurde auf dem Exon 3 eine Deletion der Aminosäure Asparagin auf der Position 44 der Sequenz festgestellt. Die Biopsie erfolgte 7,5 Monate nach der Geburt des Patienten. In dem Arztbrief wird ohne Werteangaben ein ausbleibender Testosteronanstieg nach hCG-Provokation beschrieben. Weitere Hormonwerte sind nicht genauer angegeben. Dieser Patient ist der übergeordneten Gruppe „Patienten mit Verdacht auf eine Gonadendysgenesie“ einzuordnen, bei dem im APOD-Assay eine erniedrigte APOD-Induktion (1,46-fach) festgestellt wurde (Cut-Off-Wert: 2,29) und somit eine funktionelle Androgenresistenz besteht. Es wurde aufgrund der Klinik einer penoskrotalen Hypospadie und eines Penis mit einer Länge von 2,8 cm im nicht gestreckten Zustand eine Genital-maskulinisierende Aufbauplastik mit Penisschaftraufrichtung durchgeführt. Die durchschnittliche Länge eines Penis in diesem Alter beträgt bei Streckung 4,3 cm mit einer Standardabweichung von 2,3 cm, sodass der Penis nicht als Mikropenis gewertet wird [74],[75]. Das Skrotum wird als gering hypoplastisch mit einer minimalen bifiden Raphe beschrieben. Beidseits sind die Hoden klein, links ist der Hoden in das Skrotum deszendiert, rechts befindet sich der Hoden supraskrotal. Zusammenfassend ergibt sich der Virilisierungsgrad von 3 nach Sinnecker et al. [60]. Es wurde eine Hodenbiopsie für eine mikroskopische und elektronenmikroskopische Beurteilung durchgeführt. Die Leydig-Zellen waren sehr spärlich vorhanden und atrophisch. Die Umwandlung von Gonozyten in Spermatogonien ist im linken Hoden vermindert und fehlt rechtsseitig ganz. Das *NR5A1*-Gen wurde zuerst mit Sanger-Sequenzierung untersucht und dann außerhalb dieser Arbeit per NGS Exom-sequenziert und es wurde keine weitere Mutation festgestellt.

3.2.2 Patienten mit DSD unklarer Genese

Die folgenden Patienten setzen sich aus den beiden Übergruppen „Patienten mit klinischem Verdacht auf AIS und ohne AR-Mutation (Patient GF-264 und Patient GF-114)“ und „Patienten mit Verdacht auf oder einer nachgewiesener Gonadendysgenesie und ohne AR-Mutation (Patient GF-318)“, bei denen eine regelrechte APOD-Induktion festgestellt und nun in dieser Arbeit eine *NR5A1*-Mutation entdeckt wurde.

3.2.2.1 Patient GF-264

Bei dieser mittels Sanger-Sequenzierung festgestellter Mutation, Arg39His, handelt es sich um eine Missense-Mutation aus dem das ursprüngliche Arginin zu einem Histidin wird. Die Biopsie erfolgte etwa 3 Monate nach der Geburt. Der APOD-Wert von 6,13 liegt über den

Cut-Off Wert von 2,29. Die klinische Diagnose bei diesem Patienten beinhaltet eine penoskrotale Hypospadie mit einer Schaftkrümmung, ein hypoplastisches Skrotum bipartitum und einen Penis, der im nicht erigierten Zustand etwa 3 x 2 cm groß ist (Länge x Umfang). Bei der Messung eines gestreckten Penis für das Alter von 0-5 Monaten nach Feldman et al. [74] beträgt der Durchschnitt 3,9 cm mit einer Standardabweichung von 1,9 cm sodass der Penis erheblich kleiner ist als der Durchschnitt, jedoch noch nicht klinisch als Mikropenis zu bezeichnen ist. Die Hoden sind deszendiert. Zusammenfassend besteht ein Virilisierungsgrad 2-3 nach Sinnecker et al. [60]. Bei dem Patienten wurde eine Schaftaufrichtung, eine Harnröhrenrekonstruktion und eine Skrotalhautplastik zur Vereinigung der beiden Hemiskrota durchgeführt. Eine durchgeführte MCU schloss das Vorhandensein von Müller'schen Derivaten und eines Sinus urogenitalis aus. Es liegen keine Hormonbefunde zu diesem Patienten vor.

3.2.2.2 Patient GF-114

Bei diesem Patienten wurde bei der Sanger-Sequenzierung eine Mutation im Exon 2 entdeckt, bei der aus der Aminosäure Glycin ein Stoppcodon im Exon 2 entsteht. Der Patient war zu dem Zeitpunkt der Biopsie der genitalen Fibroblasten aus dem Skrotum 8 Jahre alt. Die APOD-Induktion (6,94-fach) weist auf eine regelrechte AR-Funktion hin (Cut Off-Wert 2,29). Zu den klinischen Diagnosen gehören eine Hypospadie, ein Penis, der zu dem Zeitpunkt gestreckt 5 cm (Durchschnittslänge: 6,3 cm, Standardabweichung: 3,8 cm) lang ist, ein Skrotum bipartitum und ein Kryptorchismus. Die Hoden mit einem Volumen von 0,5 ml beidseits befinden sich bei Zustand nach Orchidolyse und Orchidopexie intraskrotal. Ein Virilisierungsgrad von 2 nach Sinnecker et al. [60] ergibt sich aus der Zusammenschau der Befunde. Dieser Patient hat eine unauffällige Familienanamnese sowie eine unauffällige frühkindliche Entwicklung. Das basale Testosteron lag im Alter von 8 mit 0,17 nmol/l im Normbereich (0,1-0,8 nmol/l), nach hCG-Stimulation mit 5000 IE nach 24 kam es jedoch zu keiner Erhöhung des Testosterons (< 0,7 nmol/l) (Normbereich: Ein Anstieg des Testosterons auf > 3,5 nmol/l bei präpubertären Jungen nach drei Tagen). Dieser Patient gehörte trotz der nicht vorhandenen hCG-Stimulation in Abbildung 4 auf S. 10 zu der letzten Gruppe der Patienten mit klinischem Verdacht auf AIS und ohne AR-Mutation zu der Arbeit von Hornig et al. [10]: diese Konstellation wird in der Diskussion näher betrachtet (siehe Kapitel 4.1.2.2). DHT befand sich im Normbereich (0,1-0,6 nmol/l) mit 0,6 nmol/l. Der basale FSH-Wert war mit 3,4 IU/L leicht erhöht (Normbereich: < 0,5-2,2 IU/L). Der stimulierte FSH-Wert lag bei

8,38 IU/L und war auch erhöht (Normbereich: 2,6-6,3 IU/L). Der basale sowie der stimulierte LH-Wert waren beide kaum nachweisbar und deshalb bei diesem Patienten als erniedrigt einzustufen (basal: 0 IU/L bei einem Normbereich von < 0,3- 2,5 IU/L und stimuliert: 0,66 IU/L bei einem Normbereich von 1,3-3,8 IU/L).

3.2.2.3 Patient GF-318

Die Biopsie erfolgt bei einem Alter von 2,5 Monaten des Patienten. Es wurde eine Mutation in Intronbereich mittels Sanger-Sequenzierung entdeckt, bei der es zu einer Veränderung der Base von Thymin zu Adenin kommt. Der APOD-Wert von 4,67 liegt über dem Cut-Off-Wert von 2,29 sodass eine regelrechte AR-Funktion vorliegt. Zur Klinik bei diesem Patienten gehören eine Phokomelie der oberen Extremität, eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, der Nachweis eines Sinus urogenitalis, der Tuben, eines Uterus und ein Hodenhochstand im Leistenkanal. Der genitale Befund zeigt einen nicht sichtbaren Penis mit glandulärer Hypospadie, welcher schürzenartig vom Skrotum verdeckt ist. Nach Zurückdrängen des Skrotum ist der optisch verkürzte Penis zu sehen im nicht erigierten Zustand 1-2 cm (Durchschnittslänge: 3,9 cm; Standardabweichung: 1,9 cm) lang und der Umfang beträgt etwa 1 cm. Müller'sche Derivate wurden durch eine MCU auch als nachgewiesen angegeben, sodass dieser Patient zu der ursprünglichen Gruppe von Patienten mit wahrscheinlich anziehender Gonadendysgenesie gehört, bei dem eine regelrechte APOD-Induktion dann festgestellt wurde. Es ergibt sich zusammenfassend ein Virilisierungsgrad von 2 nach Sinnecker et al. [60]. Zum körperlichen Befund wird zusätzlich eine angedeutete Zungenspalte, eine breite, eingefallene Nasenwurzel, ein Epikanthus und ein Hypertelorismus beschrieben. In den Briefen wurden aufgrund der Klinik Parallelen zum Robinow-Syndrom diskutiert. Das Testosteron basal und nach hCG-Provokation mit 600 IE lag beide Male im Normbereich mit 7,3 nmol/l (Referenzbereich: 0,5-12,6 nmol/l) bzw. nach 72 h bei 23,9 nmol/l (Referenzbereich: Ein Anstieg des Testosterons auf > 3,5 nmol/l bei präpubertären Jungen nach drei Tagen). Auch das DHT befand sich im Normbereich mit 2,3 nmol/l (Referenzbereich: < 0,1-2,6 nmol/l). Diese Werte weisen auf eine suffiziente Leydigzellenfunktion hin, was wiederum gegen eine Gonadendysgenesie spricht.

3.3 Dreidimensionale Modellierung der unbekannten Mutationen

Im Folgenden werden die drei identifizierten Missense-Mutationen, insbesondere der Abschnitt des prädiktiven Aminosäureaustausches dargestellt.

3.3.1 Patient GF-257 (Glu330Asp)

Das 3D-Modell (siehe Abbildung 7) der Mutation Glu330Asp zeigt prädiktiv eine sterische Änderung im Bereich der LBD durch die veränderte Ausrichtung der Asparaginsäure im Vergleich zu dem Wildtyp. Die Konformation des Proteins bleibt unverändert.

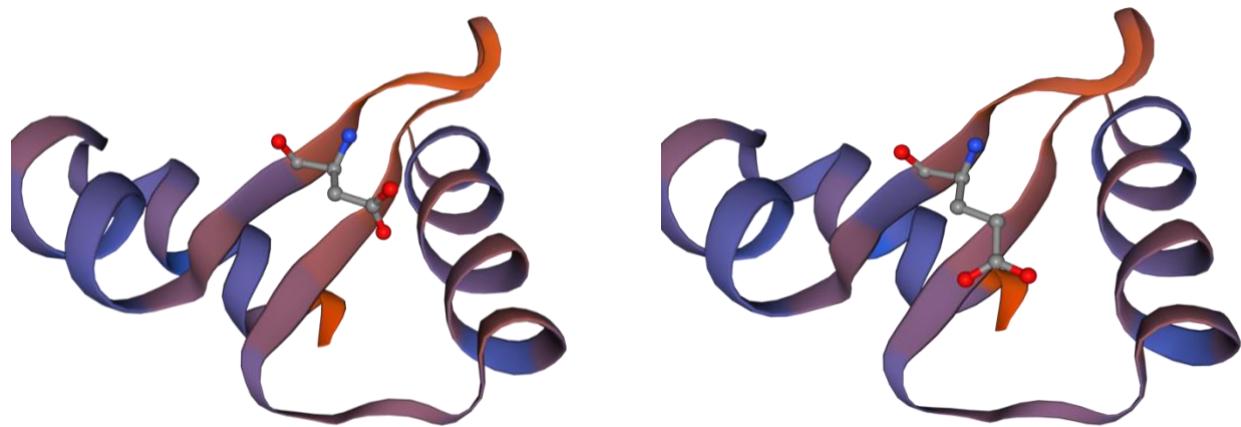


Abbildung 7: Bild links: Darstellung eines Abschnitts rund um den Wildtyp der Aminosäure Glu330 (Lokalisation etwa Mitte des Bildes bei Sichtbarkeit des Säurerests). Bild rechts: Darstellung desselben Abschnitts um die Mutation Glu330Asp bei veränderter Ausrichtung des Asparaginsäurerests.

3.3.2 Patient GF-259 (Asn44del)

Das 3D-Modell (siehe Abbildung 8) der Mutation Asn44del zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine minimale Verkleinerung des Proteins bei Verlust der Asparaginsäure auf Position 44. Es kommt dadurch prädiktiv zu einer leicht veränderten Konformation des Proteins im Bereich der DBD.

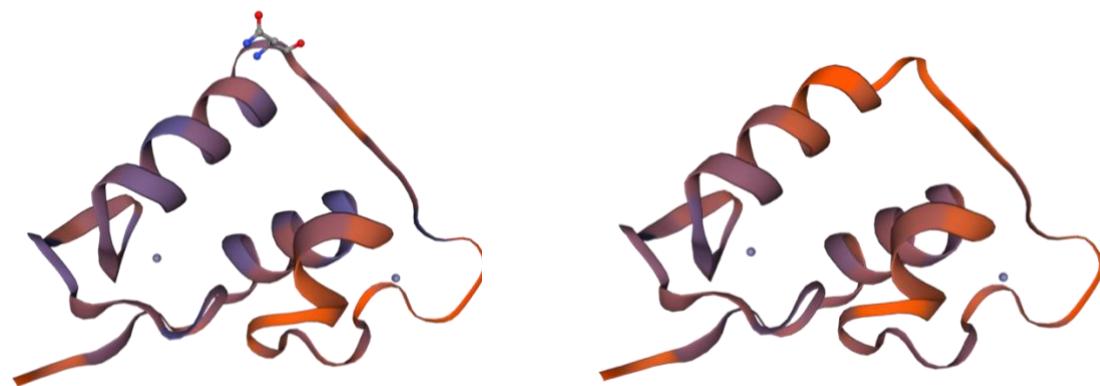


Abbildung 8: Bild links: Darstellung des Abschnitts um Asn44 (Asparaginsäurerest befindet sich mittig oben). Bild rechts: Darstellung eines etwas kleineren Proteins, besonders zu sehen im Bereich der Deletion der ursprünglichen Asparaginsäure auf Position 44.

3.3.3 Patient GF-264 (Arg39His)

Dargestellt ist der Proteinabschnitt (siehe Abbildung 9), in dem sich die Mutation befindet. Die 3D-Darstellung des Proteinbereiches in der DBD dieser Mutation (Arg39His) ist im Vergleich zum Wildtyp physikalisch prädiktiv nicht verändert. In diesen Modellen kann aber eine Protein-Protein-Interaktion, welche mittels dieses Prädiktionsprogrammes nicht dargestellt werden kann, nicht ausgeschlossen werden. Die Seitenketten der Aminosäuren könnten unterschiedlich herausragen und die Gesamtstruktur verändern.

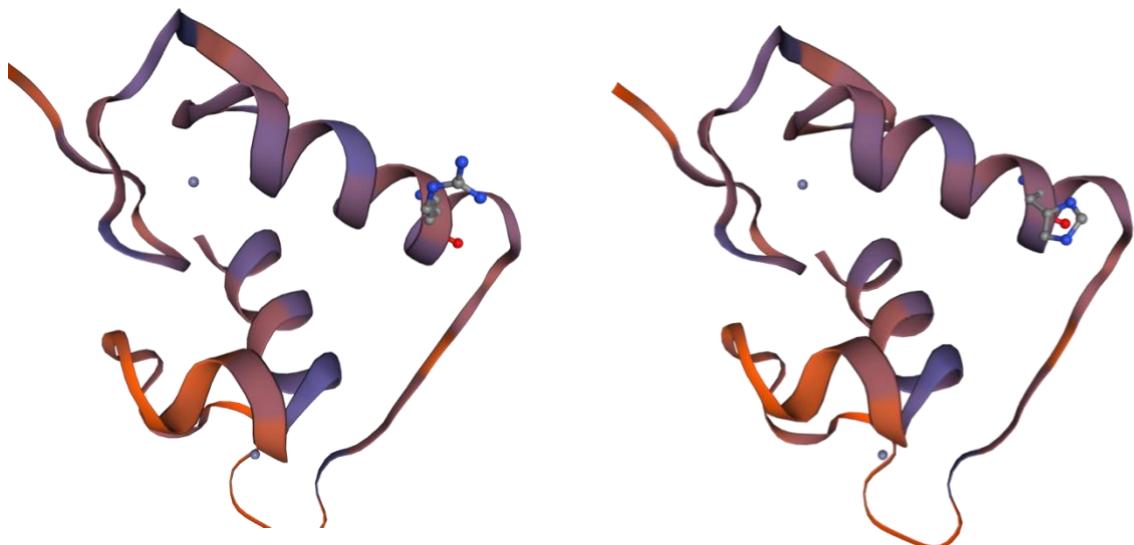


Abbildung 9: Linkes Bild: Abschnitt rund um die Aminosäure Arg39 mit Darstellung des Säurerests (rechts oben). Rechtes Bild: Gleicher Abschnitt mit Änderung der Aminosäure auf Position 39 (rechts oben) in die Aminosäure Histidin (Arg39His); die Struktur weist keine ausgeprägte Veränderung auf.

3.3.4 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Es wurden auch SNPs entdeckt (siehe Tabelle 4), die schon bekannt sind und keinen schädigenden Effekt auf die Proteinstruktur besitzen. Informationen zu den jeweiligen Mutationen wurden dem NCBI und dem UCSC-Browser entnommen.

Lokalisation im SF-1	SNPs	Patienten-ID
Exon 4	p.Gly146Ala (c.437G>C) rs1110061 Chr9:124500523	GF-88 GF-94 GF-95 GF-270
Exon 5	Benigne Variante in Intron 4 rs2297605 Chr9:124493169	34 % aller Patienten in dieser Arbeit (28 von 82 Patienten) besitzen diese Intron 4 Variante

Tabelle 4: Die in der Arbeit festgestellten SNPs bei Sequenzierung des *NR5A1*-Gens.

4 Diskussion

Bisher sind in der Human Gene Mutation Database über 100 Mutationen im *NR5A1*-Gen aufgelistet und werden meist mit der Klinik bei 46,XY DSD Patienten assoziiert [5],[87]. Es steht fest, dass fast alle Mutationen auf diesem Gen heterozygot sind [4],[5]. Knock-out-Mäuse mit einer homozygoten Mutation wiesen eine Abwesenheit der Nebenniere bei testikulärer Dysgenesie und persistierenden Müller'schen Strukturen auf [31]. Die meisten Mutationen sind im Exon 1-3 im *NR5A1*-Gen bzw. in der DBD im SF-1 Protein lokalisiert und sind entweder heterozygot oder compound heterozygot [39]. In dieser Arbeit wurden auch die Mutationen p.Gly26Stop, p.Arg39His und p.Asn44del in der DBD festgestellt. Das breite Spektrum der Klinik bei einer *NR5A1*-Mutation macht es schwer, eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation festzustellen. Dabei könnten auch die Mechanismen für die Regulation des *NR5A1*-Gens eine wichtige Rolle spielen. Eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, Phospholipiden, Co-Faktoren sowie auch die posttranskriptionale Modifikation sind an der Regulation beteiligt und müssen näher untersucht werden, da noch viele Fragen offen sind [9],[17],[73].

In der vorliegenden Arbeit wurden sieben heterozygote Mutationen bei Patienten ohne Nebennierenrindeninsuffizienz entdeckt. Des Weiteren entsprechen die entdeckten Mutationen nicht wie Achermann et al. [5] zufolge, dem erwarteten klassischen Phänotyp einer *NR5A1*-Mutation, da manche *NR5A1*-mutationspositive Patienten in unserer Arbeit keine gonadale Dysgenesie oder persistierende Müller'sche Strukturen aufweisen. Das allgemein bekannte klinische Spektrum von *NR5A1*-Mutationen wird durch die angegebene Hormonkonstellation in Kombination mit der Klinik bei diesen Patienten in dieser Arbeit erweitert. In beiden Gruppen DSD unklarer Ursache und AIS Typ II befinden sich auch 46,XY Individuen, bei denen während der Fertigstellung der Arbeit mittels NGS bekannte pathogene Mutationen in den Genen *SRD5A2* sowie *17bHSD3* festgestellt wurden. Die Mutation Asn44del wurde schon vorher von Yu et al. beschrieben [73], sonst ist bei Abschluss dieser Arbeit keine weitere *NR5A1*-Mutation bekannt gewesen. Es handelt sich also um 6 Erstbeschreibungen. 3 Patienten bzw. 13,6 % in der Gruppe der 22 AIS Typ II-Patienten haben somit neben einer funktionellen Androgenresistenz eine *NR5A1*-Mutation, wobei GF-161 zwei Mutationen im *NR5A1*-Gen hat. Im Gegensatz dazu lag nur bei 5% bzw. 3 von 60 Patienten mit DSD unklarer Genese eine *NR5A1*-Mutation vor. Insgesamt haben 6 Patienten aus insgesamt 82 Patienten (7,3 %) eine bzw. zwei *NR5A1*-Mutationen.

4.1 Patienten

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der *NR5A1*-mutationspositiven Patienten (3 Patienten mit AIS Typ II und 3 Patienten mit DSD unklarer Ursache bei regelrechter APOD-Induktion) diskutiert.

4.1.1 AIS Typ II-Patienten

Ein wichtiger Aspekt in dieser Arbeit ist die Frage nach Beeinträchtigung der AR-Funktion durch eine Mutation im *NR5A1*-Gen. Da in der vorangegangenen Arbeit der AG Pädiatrische Endokrinologie in Kiel von Hornig et al. [10] AIS Typ II definiert als funktionelle Androgenresistenz ohne AR-Mutation festgestellt wurde, bestand die Frage, ob ein anderes Gen als der AR für den AIS Typ II-Phänotyp ursächlich ist und ob dieses Gen bei Mutation sogar Einfluss auf die AR-Aktivität ausübt [7]. Wie schon in der Einleitung beschrieben, sind Fälle bekannt, bei denen man aufgrund des Phänotyps des Patienten zuerst von einem AIS ausging, aber dann eine *NR5A1*-Mutation im Nachhinein festgestellt wurde [8],[9].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Androgenresistenz (AIS Typ II), ermittelt durch den APOD-Assay gleichzeitig mit einer in dieser Arbeit festgestellten *NR5A1*-Mutation vorzufinden ist: In der Kohorte mit 22 AIS-Typ II-Patienten sind interessanterweise 3 Patienten (13,6 %) mit einem funktionell nachgewiesenen AIS und auch einer *NR5A1*-Mutation identifiziert worden. Bei Patient GF-161 und GF-257 ging man im Rahmen vorangegangener Arbeiten [10] vor der Durchführung des APOD-Assay von einem Verdacht auf AIS aufgrund des Phänotyps aus, wobei in dieser Arbeit bei GF-161 nach Zusammenschau der Arztbriefe eher der Verdacht auf eine gonadale Dysgenesie besteht. Bei dem Patienten GF-259 steht aufgrund des nicht erhöhten Testosteronwertes nach hCG-Stimulation der Verdacht auf eine gonadale Dysgenesie im Vordergrund. Diese 3 Patienten mit einer nachgewiesenen funktionellen Androgenresistenz bzw AIS Typ II werden nachfolgend vorgestellt.

4.1.1.1 Patient GF-161 mit den Ser203Arg und Mutationen Pro205Hisfs*91

Bei diesem phänotypisch weiblichen Patienten kam es mithilfe der MCU zu einem Nachweis eines Sinus urogenitalis. Klinisch wurden eine Klitorishypertrophie und ungeformte Labienbeschrieben. Gleichzeitig zeigen sich bei dieser 3,3 Monate alten Patientin ein erniedrigter Testosteronwert von 0,048nmol/l (Normbereich: 0,1-3,1 nmol/l) sowie durch die erniedrigte APOD-Induktion von 2,05 (Cut-Off-Wert 2,29) ein AIS Typ II. Diese

Kombination, also ein erniedrigtes Testosteron und zugleich der Nachweis einer gestörten Androgenwirkung könnte auf eine ursächliche Rolle der *NR5A1*-Mutaton hindeuten. Weitere Hormonwerte waren nicht mit angegeben und es lässt sich retrospektiv die Zuordnung des Patienten als Verdacht auf AIS bei einmalig niedrig gemessenem basalem Testosteron nicht eruieren. Aufgrund der Anonymisierung der Patienten besteht keine Möglichkeit, auf weitere detaillierte Daten zurückzugreifen oder den Patienten zu kontaktieren. In dieser Arbeit wurde in benachbarten Regionen des Exons 4 zwei neue Mutationen auf einem Allel festgestellt. Bisher wurde zu der Aminosäure Ser203 eine weitere Missensevariation beschrieben, bei der die Basenkombination von AGC zu AGA (rs1335105264) geändert wird, jedoch gibt es bisher noch keine weiteren Daten zu der klinischen Ausprägung dieser Mutation, da es sich um eine Erstbeschreibung handelt. Bei der von uns untersuchten Mutation, Ser203Arg, entsteht aus dem Basentriplett AGC ein AGG und Serin wird zu Arginin. Der SIFT Score beträgt 0,04 und spricht für eine schädigende Auswirkung, während der Polyphen Score von 0,374 von einer unauffälligen Variation ausgeht. Bei der weiteren Mutation, Pro205Hisfs, nur 2 Aminosäuren weiter, kommt es aufgrund einer Leserasterverschiebung ab dieser Stelle zu einem Verlust der Proteinfunktion.

Eine benachbarte Mutation, Gln206ThrfsX20, wurde von N. Camats et. al [76] bei einem 46,XY Patienten mit äußerlich weiblichen Genitalien und Gonaden in der Labia majora bei Abwesenheit der Müller'schen Strukturen beschrieben. Die Frameshift-Mutation befindet sich in der Hinge Region und führt zu einem gekürzten Protein ohne LBD, sodass dadurch das SF-1 inaktiv wird. Die Laborwerte waren in ihrer Arbeit im Hinblick auf das Testosteron auffällig, da bei dem 14 Tage alten Patienten das Testosteron bei hCG Stimulation nicht respondierte. Das ACTH wurde im Alter von 6 Jahren bei dem Patienten gemessen und war erhöht; das Kortisol war beim ACTH-Test vermindert, was auf eine primäre Nebennierenrindeninsuffizienz hinweist. Leider sind keine Hormonkonzentrationen berichtet worden, sodass Fragen bezüglich dieser Konstellation unbeantwortet bleiben. Im Alter von 2 Jahren wurde bei den Patienten eine Gonadenbiopsie durchgeführt. Diese zeigte histologisch in der Trichromfärbung das Interstitium mit wenigen Nestern von lipid-artigen Leydig-Zellen. Mithilfe der Osmium-Färbung wurde festgestellt, dass die zytoplasmatischen Vakuolen der Leydig-Zellen Lipide enthalten, die in histologisch gesunden Gonaden nicht präsent sind. Es waren prädominante Sertoli Zellen, aber keine Spermatogonien vorzufinden. Bei unserem sowie in ihrer Arbeit phänotypisch weiblichen Patienten zeigt sich durch die Leserasterverschiebung prädiktiv ein Verlust der Proteinfunktion. Unser Patient mit der Missense-Mutation Ser203Arg und darauffolgenden Frameshift-Mutation Pro205Hisfs*91 im

NR5A1-Gen zeigt eine hochgradige Virilisierungsstörung. Das verminderte Testosteron unseres GF-161-Patientens könnte auch auf spärliche Sertoli-Zellen sowie auf Leydig-Zellen, die zu einem erheblichen Teil durch Lipide ersetzt sein können, hinweisen. Ein nicht vorhandener Testosteronanstieg im hCG-Test hätte diesen Verdacht bestärkt. Der APOD-Assay zeigt eine verminderte Transkriptionsaktivität des AR und somit zusätzlich eine funktionelle Resistenz des AR gegenüber Androgenen. Die Kombination beider Mutationen stellt durch den Frameshift eine disruptive Mutation dar. Der Phänotyp sowie das erniedrigte basale Testosteron sind hinweisend, dass die Mutationen ursächlich sein könnten über den Mechanismus einer Gonadendysgenesie. Zusätzlich spricht der fehlende APOD-Anstieg im Zellkulturmodell dafür, dass die *NR5A1*-Mutation einen negativen Einfluss auf die AR-Signaltransduktion haben könnte. Dies müsste durch Co-Transfektionsuntersuchungen in vitro (Reportergen-Assay) funktionell belegt werden, welche jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Doktorarbeit war.

4.1.1.2 Patient GF-257 mit der Mutation Glu330Asp

Dieser Patient zeigt bei einer phänotypisch weiblichen Klinik mit einer Klitorishypertrophie eine Missense-Mutation im Exon 5 des *NR5A1*-Gens. Der gemessene basale Testosteronwert war im Alter von 2,4 Jahren mit 3,1 nmol/l (Normbereich: 0,1-0,7 nmol/l) erhöht und nach hCG-Provokation normal auf 4,2 nmol/l 48h nach Stimulation ansteigend sodass offensichtlich die Hoden funktionsfähig sind (Normbereich von T nach hCG-Gabe: >3,5 nmol/l nach drei Tagen bei präpubertären Jungen). Die LH- und FSH-Werte des Patienten sind für sein Alter von 2,4 Jahren auffällig erhöht. Laborchemisch hohe LH- und FSH-Werte und das stark erhöhte basale Testosteron sprechen hormonell für eine Androgenresistenz, die sich bei diesem AIS Typ II-Patienten durch eine geringe APOD-Induktion (2,13-fach) auch funktionell im Zellkulturmodell zeigt. Gleichzeitig wurde bei diesem Patienten neben der Androgenresistenz nun auch in dieser Arbeit die Mutation Glu330Asp im *NR5A1*-Gen festgestellt. Eine solche Hormonkonstellation mit einer gleichzeitig bestehenden *NR5A1*-Mutation bei diesem Patienten wirft die Frage auf, ob nicht eine Interaktion zwischen dem SF-1 und dem AR-Rezeptor bestehen könnte. Passend dazu liefert die Arbeit von Jorgensen et al. [77] Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor SF-1 und dem AR. Sie zeigt, dass eine in vitro stimulierte Überexpression einer konstitutiv aktiven Form des SF-1 (SF-1ALBD) die AR-induzierte Suppression des bovinen LH β -Promotors aufhebt. Das LH ist ein Peptidhormon, das in der Adenohypophyse ausgeschüttet wird und beim Mann die Leydig-Zellen zur

Androgensynthese stimuliert, welche wiederum durch Bindung an den AR ihre Wirkung entfalten [62],[78]. Das SF-1 ist neben den Transkriptionsfaktoren Egfr-1 und Pitx essentiell für die Aktivität des LH β Promoters, sodass die Abwesenheit einer dieser Proteine die Aktivität aufhebt [79],[80]. In der erwähnten Arbeit wird gezeigt, dass der AR den LH β Promotor durch negative Rückkopplung reguliert, aber nicht direkt an den Promotor sondern spezifisch an einen der Transkriptionsfaktoren bindet und somit die Synergie der drei Proteine an dem LH β Promoter unterbricht [77]. Patient GF-257 zeigt erhöhte LH- und FSH-Werte sowie eine Mutation in der LBD des SF-1. Es erfolgt womöglich eine Interaktion zwischen mutierten SF-1 und dem AR, die zu einer fehlenden Unterdrückung der LH-Produktion führt, sodass sie unkontrolliert voranschreitet und im Labor einen erhöhten LH-Wert anzeigt. Es könnte sein, dass durch die Mutation des SF-1 im LBD eine fehlerhafte und verstärkte Bindung an den AR, aber auch an den LH β Promotor entsteht. Einen entsprechenden Beweis für solch eine Interaktion könnte durch gezielte Co-Transfektionsuntersuchungen in zukünftigen Arbeiten belegt werden.

Durch die Erhöhung von LH aufgrund der fehlenden AR-Suppression sollten verstärkt Androgene gebildet werden; dies trifft auch auf unseren Patienten zu. Zur weiteren Untersuchung dieser LH-Erhöhung gäbe es auch die Möglichkeit zur Sequenzierung des LH-Gens, da eine Mutation womöglich auch zu einer fehlenden Aktivierung des LH-Rezeptors führt. Des Weiteren weist der Patient durch seinen klinisch weiblichen Phänotyp eine nicht wirksame zelluläre Wirkungsvermittlung des AR, beweisend durch die reduzierte APOD-Induktion. Als eine Erklärung der Laborwerte könnte die *NR5A1*-Mutation, die zu einer erheblichen Reduktion der AR-Aktivität führen kann, sein und sich dadurch eine klinische Androgenresistenz mit den entsprechenden Testosteron-, LH- und FSH-Werten entwickelt. Das SF-1 könnte wie in dieser Arbeit von Jorgensen et al. [77] als Modulationsfaktor zwischen dem AR und androgenresponsiven Elementen eine wichtige Rolle spielen oder an dem AR selbst eine uns noch unbekannte Auswirkung haben und sollte in dieser Hinsicht in der Zukunft näher untersucht werden. Interessant sind die regelrechten basalen und stimulierten Testosteronwerte, die gegen eine Gonadendysgenesie sprechen, aber wie auch schon vorangegangene Fälle [9],[30] zeigen, dass eine *NR5A1*-Mutation nicht immer klassisch mit einer Gonadendysgenesie einhergehen muss und diese Mutation in diesem Fall womöglich inaktivierend auf den AR wirkt.

4.1.1.3 Patient GF-259 mit der Mutation Asn44del

Dieser Patient gehört zu der übergeordneten Gruppe der Patienten mit Verdacht auf eine Gonadendysgenesie, bei dem im Rahmen der Forschung in der AG Pädiatrische Endokrinologie in Kiel die AR-Aktivität mittels APOD-Assay untersucht und aufgrund der erniedrigten APOD-Induktion (1,46-fach) (Cut-Off-Wert: 2,29) eine funktionelle Androgenresistenz festgestellt wurde. In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Mutation Asn44del im *NR5A1*-Gen entdeckt. Bei diesem Patienten wird äußerlich eine Virilisierungsstörung 3. Grades nach Sinnecker et al. [60] beschrieben und es ergibt sich ein Verdacht auf eine Gonadendysgenesie aufgrund der mikroskopischen Beurteilung der Hoden: Spärliche atrophische Leydig-Zellen sowie eine verminderte Umwandlung von Gonozyten in Spermatogonien im linken Hoden bzw. eine fehlende Umwandlung im rechten Hoden. Des Weiteren steigt das Testosteron nach hCG-Stimulation nicht an. Das ist ein klassischer Befund bei einem Nachweis einer *NR5A1*-Mutation. Es könnte sein, dass die festgestellte Deletion, die sich zwischen den beiden Zinkfinger in der DBD befindet [81], ursächlich für die Virilisierungsstörung ist. Genauere Angaben der Hormonwerte wie FSH, LH sowie DHT und Testosteron hätten den Befund einer Gonadendysgenesie durch Erhöhung von FSH und LH sowie durch erniedrigtes Testosteron erhärten können. Das 3D-Modell weist eine veränderte Konformation des Proteins auf, die zu einer verkürzten bzw. verkleinerten Struktur rund um den Mutationsabschnitt führt. Die Deletion könnte somit die DNA-Bindung beeinflussen.

Die gleiche Mutation wurde schon von Yu et al. [73] bei einem 6-jährigen Patienten entdeckt. Aus deren Arbeit geht hervor, dass die Asn44del Mutation ursächlich für den Phänotyp ist. Sie berichten, dass diese Deletion zu einer 23 %-prozentigen Verminderung der Transaktivierungsaktivität im Vergleich zum Wildtyp des *NR5A1* führt. Dabei wurde die relative Luciferase-Aktivität durch Transaktivierung des mutanten SF-1 an seinem CYP11A1-Reportergen gemessen [73]. Weitere in vitro Untersuchungen sind erforderlich, um die Auswirkung der Mutation auf molekularer Ebene bei diesem Patienten festzustellen, jedoch gehen wir davon aus, eine verminderte Transkriptionsaktivität wie in der Arbeit von Yu et al. [73] aufgrund der gleichen Mutation vorzufinden. Bei unserem sowie dem Patienten von Yu et al. [73] zeigten sich erniedrigte Testosteronwerte bzw. stieg das Testosteron nach hCG-Stimulation nicht an, passend zu einer Gonadendysgenesie bei einer *NR5A1*-Mutation. Die APOD-Assay Untersuchung weist zusätzlich auf eine bisher unbekannte funktionelle Androgenresistenz hin, die den Phänotyp verstärken könnte.

4.1.2 Patienten mit DSD unklarer Genese

Im Folgenden werden die 3 *NR5A1*-mutationspositiven Patienten vorgestellt, bei denen im Rahmen des APOD-Assays durch eine regelrechte APOD-Induktion eine funktionelle Androgenresistenz ausgeschlossen wurde. Darunter befindet sich Patient GF-264, bei dem man aufgrund der Klinik zuerst von einem AIS ausgegangen ist und welches schließlich durch den APOD-Assay ausgeschlossen wurde. Auch Patient GF-114 befand sich unter den Patienten mit V. a AIS ohne Mutation des AR-Gens in der Arbeit von Hornig et al. [10], dessen Klinik nach Zusammenschau der Arztbriefe in dieser Arbeit Hinweise für eine Gonadendysgenesie liefert (siehe Kapitel 3.2.2.2). Der 3. Patient GF-318 mit Verdacht auf Robinow-Syndrom gehört zu der übergeordneten Gruppe der Patienten mit Verdacht auf eine Gonadendysgenesie mit einer regelrechten APOD-Induktion und bei dem in dieser Arbeit im Intronbereich eine Missense-Mutation festgestellt wurde.

4.1.2.1 Patient GF-264 mit der Mutation Arg39His

Dieser Patient zeigte unseren Berichten zufolge im Alter von 3 Monaten ein hypoplastisches Skrotum bipartitum, eine Penisgröße deutlich unter dem Durchschnitt seines Alters und eine penoskrotale Hypospadie. Der APOD-Assay war bei diesem Patienten oberhalb des Cut-Off-Wertes von 2,29 bei einem Wert von 6,13 sodass eine funktionelle Androgenresistenz ausgeschlossen wurde und der Patient der Kohorte DSD unklarer Ursache zugeteilt wurde. Der SIFT-Score von 0 sowie der Polyphen-Score von 0,993 für die Mutation Arg39His besagen, dass sie möglicherweise eine schädigende Auswirkung auf die Proteinfunktion hat. Der hohe CADD-Score von 28,9 spricht auch für eine pathogene Wirkung der Mutation, sodass diese Mutation der Grund für die beobachtete Virilisierungsstörung sein kann. Es wurden in den letzten Jahren auf der Position Arg39 in der DBD im hochkonservierten N-Terminus, bei der wir auch die Mutation Arg39His feststellten, in mehreren Publikationen Mutationen beschrieben, die zu unterschiedlichen klinischen Ausprägungen führen [3], [23], [82]. 2017 wurde ein Patient von Fabbri-Scallet et al. [3] mit der Mutation Arg39Cys (c.115C > T) entdeckt, die auch bei der Mutter des Patienten nachgewiesen wurde. In der körperlichen Untersuchung wurde bei dem im Paper beschriebenen 37 Tage alten Patienten ein 1,5 cm großer Phallus festgestellt und die Gonaden waren beidseits inguinal palpabel. Der Testosteronwert war im Alter von 5 Monaten im Normalbereich. Die abdominale Sonographie zeigte Gonaden, die sich inguinal befanden und keinen Nachweis der Müller'schen Strukturen. Des Weiteren war bei dieser Mutation die Steroidsynthese in der Nebennierenrinde intakt. Für den funktionellen Einfluss der Mutationen auf die

transkriptionelle Aktivierung der Zielgene wurden SF-1 respondierende Promoter der Gene AMH und StAR verwendet. Es wurde eine reduzierte Transaktivierung beider Promotoren bei der Mutation Arg39Cys gezeigt. Die strukturelle Analyse der Mutation demonstrierte keine Veränderung der Interaktionen mit den anderen Aminosäuren und keine Konformationsänderung der Zink-Finger in der DBD.

Der Elektrophoretische Mobilitäts-Shift Assay (EMSA) zeigte hingegen eine starke Reduktion der DNA-Bindekapazität und bei dem Transaktivierungs-Assay eine hohe Beeinträchtigung. Little et al. [82] zufolge sind die terminalen Gruppen in den Seitenketten von Lys38 und Arg39 zu einem gewissen Grad ungeordnet, sodass ihre Interaktionen bei der Strukturanalyse nicht konsistent detektiert werden und das Ergebnis nicht immer mit den funktionalen Assays korreliert. 2006 zeigte diese Arbeit anhand ihrer festgestellten Mutation p.Arg39Ala, dass das Potential der Transaktivierung deutlich reduziert ist. Klinik des Patienten wurde nicht angegeben.

Auf der gleichen Position wurde eine weitere heterozygote Missense-Mutation, Arg39Pro, von Philibert et al. [83] festgestellt. Dieser Patient zeigte klinisch eine Klitoromegalie, Gonaden in den Labien und eine primäre Amenorrhö. Es wurden zusätzlich erniedrigte Testosteronwerte angegeben, passend zu einer Gonadendysgenesie. 46,XY DSD Patienten mit primärer Amenorrhö können bei normal hohen Testosteronwerten AIS oder auch eine 5- α Reduktase-Mutation als Ursache haben [83].

Unser Patient GF-264 zeigt ein untevirilisiertes Genital und es ist unklar in wie weit die Gonaden beeinträchtigt sind, wobei die MCU und die Genitographie bei diesem Patienten keinen Nachweis der Müller'schen Derivate oder eines Sinus urogenitalis erbrachten. Bei fehlenden Hormonbefunden und keiner Durchführung einer histologischen Untersuchung des Hodens können wir nur mutmaßen, dass bei intakter APOD-Induktion die *NR5A1*- Mutation über den Mechanismus einer Gonadendysgenesie und konsekutiv verminderter embryonaler Androgenbildung ursächlich für den Phänotypen ist und nicht über den Mechanismus einer Androgenresistenz.

Die unterschiedlichen Missense-Mutationen aus den anderen Arbeiten [3], [27], [82], an Position Arg39 zeigen unterschiedlich ausgeprägte Virilisierungsstörungen sowie entweder normale oder erniedrigte Testosteronwerte. Mutationen in dieser Region der DBD wurden mehrere Male mit ausgeprägten Phänotypen und großen Einfluss auf die Proteinfunktion

korreliert [3], [4], [24], [33]. Die hier zitierten Arbeiten unterstützen die Annahme, dass die in dieser Doktorarbeit entdeckte Mutation den DSD-Phänotyp kausal erklären könnte.

Aufgrund des regelrechten APOD-Assays [10] lässt sich aber kein Einfluss der *NR5A1*-Mutation auf die AR-Funktion erkennen.

4.1.2.2 Patient GF-114 mit der Mutation Gly26Stopp

Die Klinik des 8-jährigen Patienten zeigt eine Hypospadie, einen 5 cm lang gestreckten Penis, ein Skrotum bipartitum sowie einen Kryptorchismus. Der Patient hat zum Zeitpunkt der Abnahme einen Testosteronwert im unteren Normbereich, welches nach hCG-Stimulation nicht anstieg. Der LH-Wert war basal und nach Stimulation auch erniedrigt, während das FSH basal leicht erhöht war und der stimulierte FSH-Wert im Normalbereich lag. FSH und LH sind in diesem Fall im präpubertären Alter des Patienten unauffällig. In der Regel zeigt sich eine Gonadendysgenesie als hypergonadotroper oder primärer Hypogonadismus und kann nur zum Zeitpunkt der Minipuberty oder während der Pubertät festgestellt werden [84]. Die gonadotropen Hormone LH und FSH wären im diesem Fall im Blutserum erhöht und Testosteron erniedrigt [85]. Ein hypergonadotroper Hypogonadismus im Rahmen des erhöhten FSH-Wertes trifft aufgrund des Alters von 8 Jahren bei unserem Patienten nicht zu und ist als unauffällig zu werten. *NR5A1*-Mutationen können jedoch auch zu einer Beeinträchtigung der Ausschüttung von Gonadotropinen führen, da das SF-1 als Transkriptionsfaktor im Hypophysenvorderlappen exprimiert wird und das LH β -Gen [59],[86], den GnRH-Rezeptor [87] und das FSH β -Gen [88] reguliert. Gewebe-spezifische Knock-out Mäuse zeigten bei Mangel an Nachweis von SF-1 Immunreakтивität im Hypophysenvorderlappen eine Hypoplasie der Gonaden sowie der äusseren Genitalien [89] und lässt vermuten, dass eine verminderte SF-1 Expression im Hypophysenvorderlappen ursächlich sein kann für den verminderten LH-Wert und der äußenen Virilisierungsstörung unseres Patienten. Es sind hingegen unter allen *NR5A1*-Mutationen auch Fälle bekannt [3], [33], bei denen die GnRH-Produktion nicht eingeschränkt ist. Der basale Testosteronwert war mit 0,17 nmol/l (Referenzbereich: 0,1-0,8 nmol/l) im Normbereich. Der nicht vorhandene Testosteronanstieg nach intramuskulärer hCG-Gabe bei unserem Patienten ist dennoch hinweisend auf eine Gonadendysgenesie. Aufgrund der Anonymisierung der Patienten liegt uns keine Möglichkeit vor, auf weitere Daten zurückzugreifen oder den Patienten zu kontaktieren.

Ein Patient mit einer Missense-Mutation, Gly26Alanin, auf der gleichen Position wie Gly26Stopp, wurde in der Arbeit von Choi et al. [90] beschrieben. Dieser Patient zeigte äußerlich weibliche Genitalien mit einer Klitoromegalie präpubertär. Testosteron und Gonadotropin-Werte waren erniedrigt. Die weitere Untersuchung dieser Mutation demonstrierte eine beeinträchtigte transkriptionelle Aktivierung der SF-1 respondierenden Promoter StAR und AMH.

Um die funktionelle Bedeutung der in dieser Arbeit festgestellten Mutation genauer zu untersuchen, wären weitere in vitro Methoden unerlässlich, jedoch kann man bei Gly26Stopp davon ausgehen, dass durch das verfrühte Stoppcodon in der DBD die Aktivität des SF-1 nahezu aufgehoben wird. Der fehlende Testosteron-Anstieg nach hCG-Gabe könnte hinweisend auf die Gonadendysgenesie, klassisch für eine *NR5A1*-Mutation sein. Diese Daten sowie die hier zitierte Arbeit unterstützen die Annahme, dass die von uns festgestellte Mutation Gly26Stopp erklärend für den Phänotyp ist. Da der APOD-Assay normal war [10], lässt sich hier kein Einfluss auf die AR-Funktion erkennen.

4.1.2.3 Patient GF-318 mit Missense Mutation im Intron-Bereich

Es wurde eine Mutation im Promotorbereich des *NR5A1*-Gens bei einem Patienten mit klinischen Parallelen zu dem Robinow-Syndrom nachgewiesen. Beim seltenen Robinow-Syndrom handelt es sich um eine Kombination aus verkürzten Gliedmaßen, Anomalien des Kopfes und des Gesichts sowie der äußeren Gliedmaßen [91]. Ursächlich für das autosomal-dominante Robinow-Syndrom sind Mutationen im *ROR2*-Gen (9q22) und im *WNT5A*-Gen (3p14.3); es sind auch autosomal-rezessive Ausprägungen bekannt. Besonders hervorzuheben ist die Identifizierung der *WNT Pathway* Gene wie zum Beispiel *WNT5B* als Androgen-programmierenden Genen in GFs im Rahmen der Geschlechtsdifferenzierung durch Holterhus et al. [92]. Bei Patient GF-318 wurde bisher keine Untersuchung auf Mutation der *WNT Pathway* Gene durchgeführt und der regelrechte APOD-Assay spricht gegen ein klassisches AIS. Lee et al. [93] untersuchte Patienten mit diesem Syndrom und stellte fest, dass bei altersgerechter Virilisierung die Patienten klinisch einen Mikropenis sowie erhöhte LH und FSH-Werte im Labor zeigten, was auf einen partiellen primären Hypogonadismus hinweist. Bei dem Patienten GF-318 wurden mittels MCU Müller'sche Strukturen beschrieben; dies schließt klinisch ein AIS weitgehend aus. Bestätigt wird das durch eine normale APOD-Induktion von 4,67 (Cut-Off-Wert bei skrotalen Fibroblasten: 2,29). Es wurden ein Uterus, Tuben sowie ein Sinus urogenitalis nachgewiesen, sodass embryonal eine inkomplette oder

keine Sezernierung von AMH stattgefunden hat. Interessanterweise befanden sich trotzdem der basale Testosteronwert und DHT im Normbereich und auch im hCG-Test kam es zu einem adäquaten Anstieg des basalen Testosterons, nicht klassisch für eine Gonadendysgenesie. Bei einer Sequenzierung des Androgenrezeptors, die zu dem Zeitpunkt der Dokumentation noch unvollständig war, wurde eine Verlängerung des CAG-Repeats auf 30 Wiederholungen statt seiner ursprünglich 20 Wiederholungen festgestellt. Wiederholungen von >37 CAG-Einheiten dieser homopolymerischen Glutamindomänen sind ursächlich für die Kennedy's disease bzw. x-linked Spinal and bulbar muscular atrophy [94],[95]. Klinisch zeigen sich bei diesen Patienten anfangs eine proximal und bulbär betonte Muskelschwäche mit Dysarthrie und Dysphagie die im Verlauf progredient werden kann. Zusätzlich können ein Hypogonadismus und eine Gynäkomastie auftreten [96],[97]. Patient GF-318 zeigt molekulargenetisch sowie klinisch abgesehen von dem Hypogonadismus keinen Hinweis für Kennedy's disease.

Da weder das Robinow-Syndrom bei diesem Patienten molekulargenetisch gesichert ist, noch ein Anhalt für eine neurogenerative Erkrankung bei diesem Patienten vorliegt, ist eine klare Ursache für die Klinik des Patienten schwierig. Aufgrund der Lokalisation der Mutation im Intronbereich ist es nicht möglich, mithilfe der Scores Einschätzungen über die Variation zu machen oder festzustellen, ob diese eine schädigende Auswirkung hat. Festzuhalten ist die bedeutsame Funktion des Promoters: Die Ermöglichung der regulierten Expression eines Gens sowie die Eigenschaft, eine spezifische Wechselwirkung mit DNA-bindenden Proteinen bzw. Transkriptionsfaktoren einzugehen [98]. Der Genitalbefund weist mittels MCU auf eine Gonadendysgenesie hin, wobei der normwertige basale sowie stimulierte Testosteronwert wiederum gegen eine komplette Gonadendysgenesie sprechen sodass möglicherweise weitere uns noch unbekannte Störfaktoren die Genotyp-Phänotyp-Korrelation beeinflussen. Ob nun die Mutation im Promotorbereich die Ursache für die Virilisierungsstörung, Grad 2 nach Sinnecker et al. [60] ist, kann nicht eindeutig beurteilt werden. Die normale APOD-Induktion spricht gegen eine funktionelle Beeinträchtigung der AR-Signalwegs.

4.2 Dreidimensionale Modellierung der Mutationen

Die 3D-Modelle der Mutationen Arg39His und Glu330Asp zeigen bei sterischer Konformationsänderung keine Strukturunterschiede zum Wildtyp. Die unterschiedlichen Seitenketten könnten jedoch den Zusammenhalt des gesamten Proteins beeinflussen und eine Interaktion mit anderen Proteinen an den veränderten Stellen beeinträchtigt werden. Die Mutationen Arg39His und Asn44del befinden sich beide in der DBD, welche, wie schon in

den vorherigen Kapiteln erwähnt, in einer erniedrigten DNA-Bindungskapazität resultieren können und daher ursächlich für die beschriebenen Phänotypen sein könnten.

Die Mutation Glu330Asp bei GF-257 in der LBD kann trotz fehlendem Strukturunterschied zum Wildtyp im Mutationsbereich auf eine Störung in der Hormonbindung hinweisen. Der AR reguliert normalerweise den LH β Promotor durch negative Rückkopplung. Das mutierte SF-1 könnte mit dem AR eine fehlerhafte oder verstärkte Bindung eingehen und zu einer fehlenden Unterdrückung der LH-Produktion führen. Dies könnte sich bei Patient GF-257 laborchemisch durch hohe LH-Werte zeigen und die nachfolgend hohe basale Testosteronwerte, kennzeichnend für eine Androgenresistenz, erklären.

4.3 Polymorphismus

Bei den Sequenzierungen wurde der Polymorphismus Gly146Ala (c.437G>C) (rs1110061) in der Hinge-Region bei 4 der 82 Patienten mit 46,XY DSD unklarer Ursache festgestellt. Der Gnomad Datenbank zufolge ist die Allelfrequenz etwa 0,12 (https://gnomad.broadinstitute.org/variant/9-127262802-C-G?dataset=gnomad_r2_1), was auf keinen seltenen SNP deutet. Er ist gleichmäßig beim weiblichen sowie beim männlichen Geschlecht ausgeprägt. Deshalb kann er als benigne Veränderung angesehen werden. Der SNP hat laut Wuquang F et al. [99] keinen schädigenden Einfluss auf die Expression des Proteins und zeigt eine regelrechte Stabilität bei Bindung mit anderen Proteinen. Bei einer experimentellen Population, die eine erhöhte Anzahl an Nebennierenrindenerkrankung aufweist ist die Frequenz dieses Polymorphismus laut ihrer Arbeit höher, sodass dieser SNP womöglich bei diesen Patienten klinisch relevant ist [99]. Laut Wada et al. [100] setzt dieser Polymorphismus die Transaktivität des SF-1 herunter, was in der Regel zu einer Virilisierungsstörung führt. Ihre Arbeit besagt, dass dieser Polymorphismus nicht die Ursache allein für die Entstehung eines Mikropenis und Hypospadie sein kann, da es auch Patienten mit diesem SNP gibt, die keine Virilisierungsstörung haben, jedoch wurde festgestellt, dass der genannte Polymorphismus bei Mikropenis häufig gefunden wird; womöglich könnte eine Interaktion zwischen dem AR und dem SF-1 eine Rolle spielen [101]. Alle unsere Patienten mit diesem Polymorphismus haben eine Virilisierungsstörung Grad 3 nach Sinnecker et al [60]. Ob dieser SNP möglicherweise zu der Virilisierungsstörung unserer Patienten beiträgt, kann insgesamt nicht konklusiv beantwortet werden.

4.4 Potentielle weitere Methoden der funktionellen Molekularbiologie

Die DNA-Sequenzierung, 3D Modelle sowie die berechneten Prognose Scores geben einen beschreibenden Überblick über die Mutationen. Um die funktionelle Beeinträchtigung der identifizierten Mutationen genauer untersuchen zu können, stehen potentiell mehrere Methoden bereit, die in der Zukunft angewendet werden könnten.

4.4.1 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Mithilfe des EMSA als Affinitätselektrophorese können DNA- oder RNA-bindende Proteine nachgewiesen werden [102]. Dabei wird die bekannte Sequenz mit einem Protein inkubiert und wie bei der Gelelektrophorese wird die Probe auf ein Gel aufgetragen und die Komplexe aus DNA und Protein im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt [103]. Abhängig von der Größe und der Ladung des Protein-Liganden-Komplexes kommt es zu einer Laufweitenverschiebung. Wenn es zu keiner Verschiebung kommt, bedeutet dies einen Verlust der DNA-Bindekapazität [104]. Es können die *NR5A1*-Mutationen mit Wildtyp-*NR5A1* verglichen werden, zum Beispiel bei Verwendung eines SF-1 reaktiven Elements, den AMH Promoter [4]. Da die DBD mit diesem Assay untersucht wird, würde eine Analyse der in dieser Arbeit gefundenen Mutationen Arg39His & Asn44del, die sich auch in dieser Domäne befinden, genauere Ergebnisse über ihren Effekt erbringen.

4.4.2 Transaktivierungs-Assay

Bei dieser Methode wird *in vitro* eine Transaktivierung, also die Stimulation einer Genexpression, erreicht. Zellen werden mit dem mutanten Gen und mit einem respondierenden Promotor transfiziert. Dabei wird durch ihre Bindung die Expression einer Luciferase unter Kontrolle dieser Promotoren ermöglicht. Daher ist die Luciferase-Aktivität ein Maß für die Aktivität des Promotors [105]. Werner et al. [4] sowie Fabbri-Scallet et al. [3] haben bei der Untersuchung von *NR5A1*-Mutationen als Promotoren AMH- und StAR-Promotoren angewendet, die Transaktivierungskapazität anhand der relativen Luciferase-Aktivität gemessen und dabei mit einem *NR5A1*-Wildtyp verglichen. Für die weitere Untersuchung der entdeckten Mutationen in dieser Arbeit würde dieser Transaktivierungs-Assay in Frage kommen.

4.4.3 Chromatin-Immunpräzipitation- Assay

Im Vordergrund steht die Feststellung von Protein-DNA-Wechselwirkungen durch das Chromatin innerhalb einer Zelle sowie der Nachweis mehrerer Proteine die mit einer Region

des Genoms assoziiert sind [106]. Dabei können jedoch auch umgekehrt mehrere Regionen des Genoms identifiziert werden, die mit einem bestimmten Protein interagieren [107]. Nach Vernetzung und Fixierung (zum Beispiel mit Formaldehyd) von DNA und Proteinen, werden die Zellen lysiert und das daraus gewonnene Chromatin durch enzymatischen Verdau fragmentiert. Bei der Immunpräzipitation wird die DNA, die an das gewünschte Protein gebunden hat, mit Antikörpern, die für das bestimmte Protein spezifisch sind, isoliert. Die resultierende Anreicherung einer DNA-Sequenz kann durch PCR oder auch durch DNA-Microarray nachgewiesen werden [107].

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurden 3 Patienten mit einer funktionellen Androgenresistenz (AIS Typ II) und einer gleichzeitig vorhandenen *NR5A1*-Mutation identifiziert. 2 Patienten, GF-161 und GF-259 mit dem Virilisierungsgrad 4 bzw. 3 nach Sinnecker et al. [60] zeigten erniedrigte Testosteronwerte, die bei GF-259 auch nach hCG-Stimulation nicht anstiegen. Wir gehen davon aus, dass die *NR5A1*-Mutationen, Ser203Arg, Pro205Hisfs*91 und Asn44del möglicherweise für die Entstehung der ausgeprägten Virilisierungsstörung eine bedeutende Rolle spielen und zu den verminderten Testosteronwerten im Rahmen einer Gonadendysgenesie führen. Die zusätzlich festgestellte funktionelle Androgenresistenz kann diesen Phänotyp verstärken (Fragestellung 1). Ob die *NR5A1*-Mutation neben der Verminderung der Androgenbildung und zu der Verminderung der Androgenwirkung beitragen, wie im APOD-Assay gezeigt, müsste durch die zuvor genannten in vitro Tests belegt werden.

Die *NR5A1*-Mutation, Glu330Asp, wurde bei einem weiteren AIS Typ II Patienten, GF-257, identifiziert. Bei GF-257 ging man vor der Durchführung des APOD-Assay von einem Verdacht auf AIS aufgrund des Phänotyps aus. Die Hormonkonstellation zeigte erhöhte Testosteron-, LH- und FSH-Werte, was Ausdruck einer ausbleibenden zellulären Wirkungsvermittlung des AR ist, beweisend durch den pathologischen APOD-Assay und weist somit auf eine funktionelle Androgenresistenz hin. Wir nehmen an, dass die *NR5A1*-Mutation den AR mit einem uns noch unklaren Mechanismus beeinträchtigen und die AR-Aktivität als Modulationsfaktor reduzieren könnte sodass dieser Phänotyp entsteht. Es müssen weitere in vitro Untersuchungen veranlasst werden, um festzustellen, in wie weit die *NR5A1*-Mutation eine bedeutende Rolle in der Beeinträchtigung der AR-Aktivität spielt (Fragestellung 1).

In dieser Arbeit wurden auch 2 *NR5A1*-mutationspositive Patienten entdeckt, bei denen der Phänotyp höchstwahrscheinlich über den Mechanismus einer Gonadendysgenesie bezogen auf die klinischen Daten entstanden ist. Diese Patienten zeigten eine regelrechte APOD-Induktion sodass eine funktionelle Androgenresistenz ausgeschlossen werden konnte. Die schon in der Literatur mehrfach beschriebene Gonadendysgenesie bei *NR5A1*-Mutationen [5],[39] unterstützen die Annahme, dass der Phänotyp verursacht wird durch die hier identifizierten *NR5A1*-Mutationen, Arg39His und Gly26Stop (Fragestellung 2)

Es ist wichtig, festzuhalten, dass das *NR5A1*-Gen ein sehr wichtiger Bestandteil der während der Embryogenese ablaufenden geschlechtlichen Determinierung sowie der Geschlechtsdifferenzierung ist. Es gibt keine klare Korrelation zwischen der Lokalisation einer Mutation, ihrer funktionellen Auswirkung und dem assoziierten Phänotyp. Interessant wäre es daher bei den Patienten in dieser Doktorarbeit, die Untersuchung des *NR5A1*-Gens bei weiteren Familienmitgliedern durchzuführen, da eine gleiche Mutation in einer Familie in mehreren Fällen phänotypische Variabilität aufweist, wobei die Gründe dafür nahezu unbekannt sind [9], [108].

Im Idealfall ist eine gefundene Mutation der Grund für eine Erkrankung bzw. für eine auffällige Klinik. Jedoch trifft dies nicht immer zu und es können bei mehreren nachgewiesenen Mutationen entweder eine von ihnen ursächlich sein oder alle zusammen kombiniert zu der Erkrankung führen. Nachdem mittels Whole-exome sequencing in kurzer Zeit viele Gene identifiziert wurden, wurden für mehrere Erkrankungen die sogenannte Oligomutation [51], [109] festgestellt. Vor allem bei 46,XY DSD Patienten können durch das sogenannte „High Throughput Sequencing“ mehrere Genvarianten durch Interaktion eine Erklärung für die vielen unterschiedlichen DSD Phänotypen sein. Laut Camats et al. [110] kann eine Oligomutation zu den individuellen heterozygoten Phänotypen führen; eine einzelne Mutation muss allein nicht schädlich wirken.

Es sollte auch die Möglichkeit der Interaktion von AR und SF-1 durch einen dritten „Spieler“ diskutiert werden, der bei einer Mutation von *NR5A1* hoch bzw. herunterreguliert wird und wiederum an den AR bindet und ihn dadurch ausschaltet. Es kann auch zu einem ungleichmäßigen Expressionsgrad von Wildtyp-Allelen zu mutanten Allelen bei diesen Patienten kommen sowie zu Unterschieden der Expression in der Promoterregion des vererbten Wildtyp-Alleles. Eine Schwachstelle in dieser Arbeit ist die fehlende Identifizierung weiterer Co-Faktoren oder Mutationen auf weiteren Genen, die eine wichtige Rolle in der Geschlechtsentwicklung spielen. Dennoch wurden in Rahmen übergeordneter Arbeiten der AG

Pädiatrische Endokrinologie in Kiel weitere Störungsfaktoren wie eine 5 α -Reduktase Defizienz oder eine 17 β HSD3-Defizienz identifiziert, die mit einem AIS Typ II gemeinsam auftreten und die AR-Aktivität als Modulationsfaktor beeinflussen können. Viele der AIS Typ II-Patienten wurden per NGS sequenziert, aber nicht alle Patienten, sodass Mutationen in anderen Genen als Ursache für AIS Typ II in Frage kommen können.

Aufgrund der unvollständigen Untersuchung bzw. Angaben der Patienten fehlen häufig aufschlussreiche Daten, wie der hCG-Test sowie eine genauere Größenbeschreibung des äußeren Genitals bei jedem Patienten, die für die Erhärting der Diagnosen zielführend wären. Ideal wären Laborwerte, wie LH und FSH, bei allen Patienten zur Feststellung einer möglichen Assoziation zwischen *NR5A1*-Mutationen, die in Kombination mit AIS Typ II atypische Laborkonstellationen aufweisen könnten. Die hCG-Tests bei den jeweiligen Patienten weichen teilweise vom Standardverfahren ab, da der stimulierte Wert von Testosteron zu unterschiedlichen Zeiten gemessen und unterschiedliche Mengen an hCG appliziert wurden bzw. nicht die Dosis angegeben wurde. In dieser Arbeit wurde zum Vergleich der vorgegebene Referenzbereich bei Messung nach 72 h nach 5000 IE hCG-Gabe [111] gewählt.

Diese Doktorarbeit zeigt erste Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem *NR5A1*-Gen und dem AR durch das gemeinsame Auftreten bei *NR5A1*-mutationspositiven Patienten mit einer funktionellen Androgenresistenz. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken die bisherigen Forschungen über die Funktion des *NR5A1*-Gens und seine Auswirkungen bei Mutationen, die in der Regel mit einer Gonadendysgenesie assoziiert sind. Die Arbeit konnte das Wissen über die *NR5A1*-assoziierten Phänotypen erweitern, was ein besseres Verständnis dieses umfangreichen Gebiets ermöglicht.

4.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 82 46,XY DSD Patienten auf eine Mutation im *NR5A1*-Gen untersucht: 67 Patienten wurden mittels Sanger Sequenzierung und 15 Patienten durch NGS sequenziert. Diese Patienten setzen sich aus 78 Patienten mit einem klinischen Verdacht auf eine funktionelle Androgenresistenz aus einer vorangegangen Arbeit von Hornig et al. [10] sowie aus 4 Patienten mit einem Verdacht bzw. einer nachgewiesenen Gonadendysgenesie zusammen. Der angewendete APOD-Assay von Hornig et al. [10] identifizierte aus den insgesamt 82 Patienten 22 mit einem AIS Typ II, einer funktionellen Androgenresistenz ohne Nachweis einer Mutation im AR und 60 Patienten mit DSD unklarer Ursache bei regelrechter APOD-Induktion. Nach Sequenzierung und Auswertung des Exons 1-7 bei diesen 82 Patienten wurden in dieser Arbeit 7 *NR5A1*-Mutationen, 6 davon bisher

unbekannt, eine davon im Promotorbereich, identifiziert. 4 heterozygote Mutationen (Ser203Arg, Pro205Hisfs*91, Glu330Asp, Asn44del) im *NR5A1*-Gen wurden bei 3 AIS Typ II Patienten festgestellt (13,6%). Die anderen heterozygoten *NR5A1*-Mutationen (Arg39His, Gly26Stopp) sowie eine Missense Mutation im Intronbereich wurden bei den 46,XY DSD-Patienten unklarer Ursache identifiziert (5%). Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass *NR5A1*-Mutationen über den Weg der Gonadendysgenesie aber möglicherweise auch, und das war bisher unbekannt, über eine Verminderung der Androgensensitivität des genitalen Androgenzielgewebes zu DSD-Phänotypen beitragen.

5 Anhang

5.1 Reaktionslösungen und Programme

25 µl PCR-Reaktionslösung mit den jeweiligen Primern von SF-1 unter Verwendung des Kits „HotStarTaq-Polymerase“, Qiagen

MIX	1x
Puffer (10-fach)	2,5
Q-Solution (5-fach)	5
dNTPS's (10mM)	0,5
Primer-Mix	1,44
HotStar Polymerase	0,13
H2O	14,43
DNA	1
Gesamt	25

Alle Werte in µl

PCR-Programm „HotStar 58,5°C“ am Arktik Cycler, Thermo Scientific:

Temperatur	Min.
95°C	15:00
94°C	1:00
58,5°C	1:00
72°C	1:00
72°C	10:00

35x

5.2 Cycle-Sequencing

20 µl Cycle-Sequenzierungsansatz unter Verwendung des Kits „BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing“

Mastermix	1x
H2O	13
5fach Puffer	2
Big Dye Terminator	1,5
Primer (vorpipettiert)	1,5
Aufgereinigtes PCR-Amplifikat	2
Gesamt	20

Alle Werte in µl

Programm „Cycle57°C“ am Mastercycler, Eppendorfer

Temperatur	Zeit
96°C	2 min
96°C	10 sec
57°C	5 sec
60°C	4 min
4°C	Pause

} 26 x

5.3 PCR-Bild der Exone 1 bis 7 des NR5A1 am Probanden GF-14

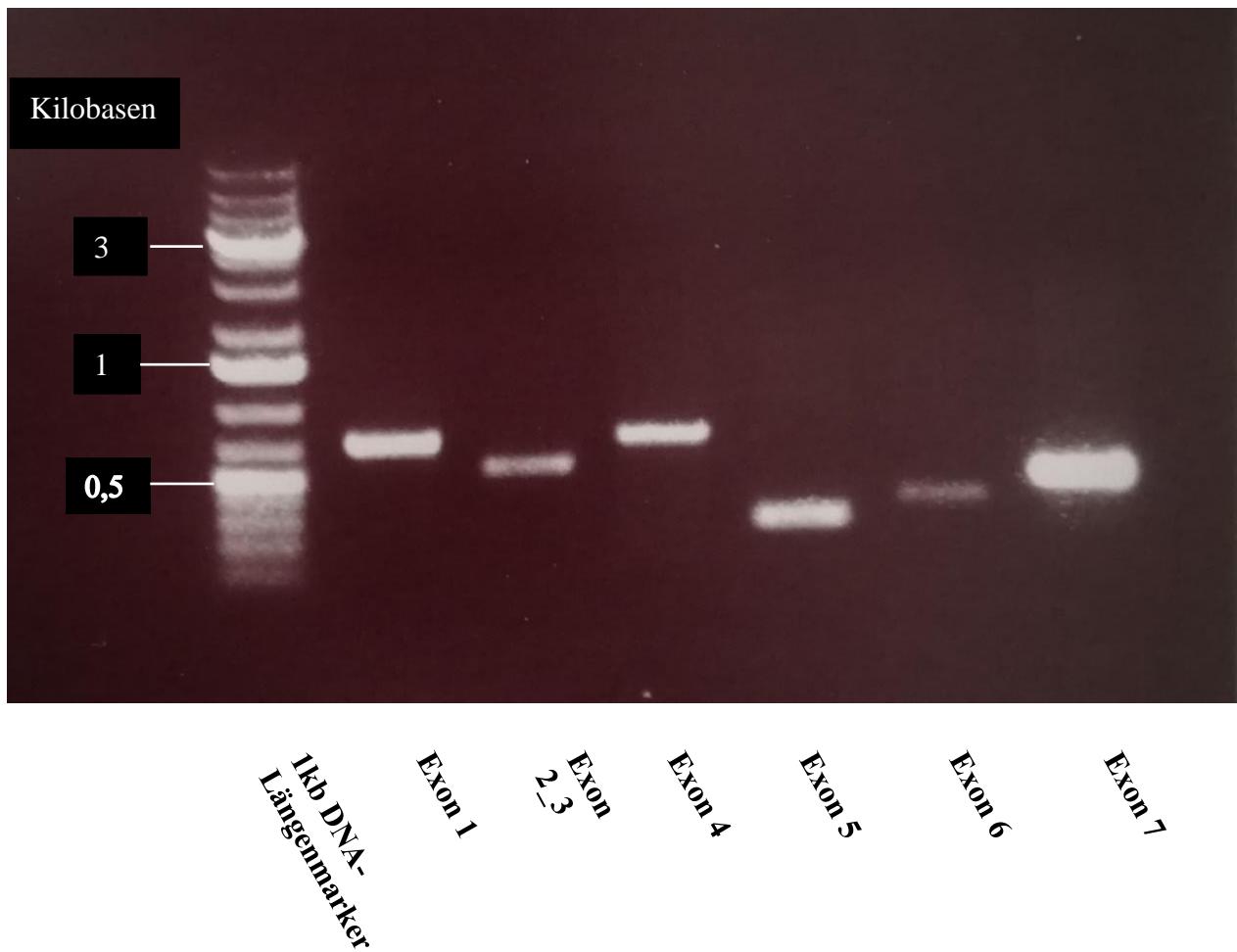


Abbildung 10: Nach Erstellung der Reaktionslösungen mit den jeweiligen Primern wurde ein PCR-Bild erstellt. Der DNA-Längenmarker stellt zum Vergleich die ungefähre Größe der Bande dar. Nebeneinander aufgelistet sind die unterschiedlichen Banden der Exone 1-7, wobei Exon 2-3 aufgrund ihrer kleinen Größe zusammengefasst sind.

5.4 Übersicht der Mutationen auf dem *NR5A1*-Gen

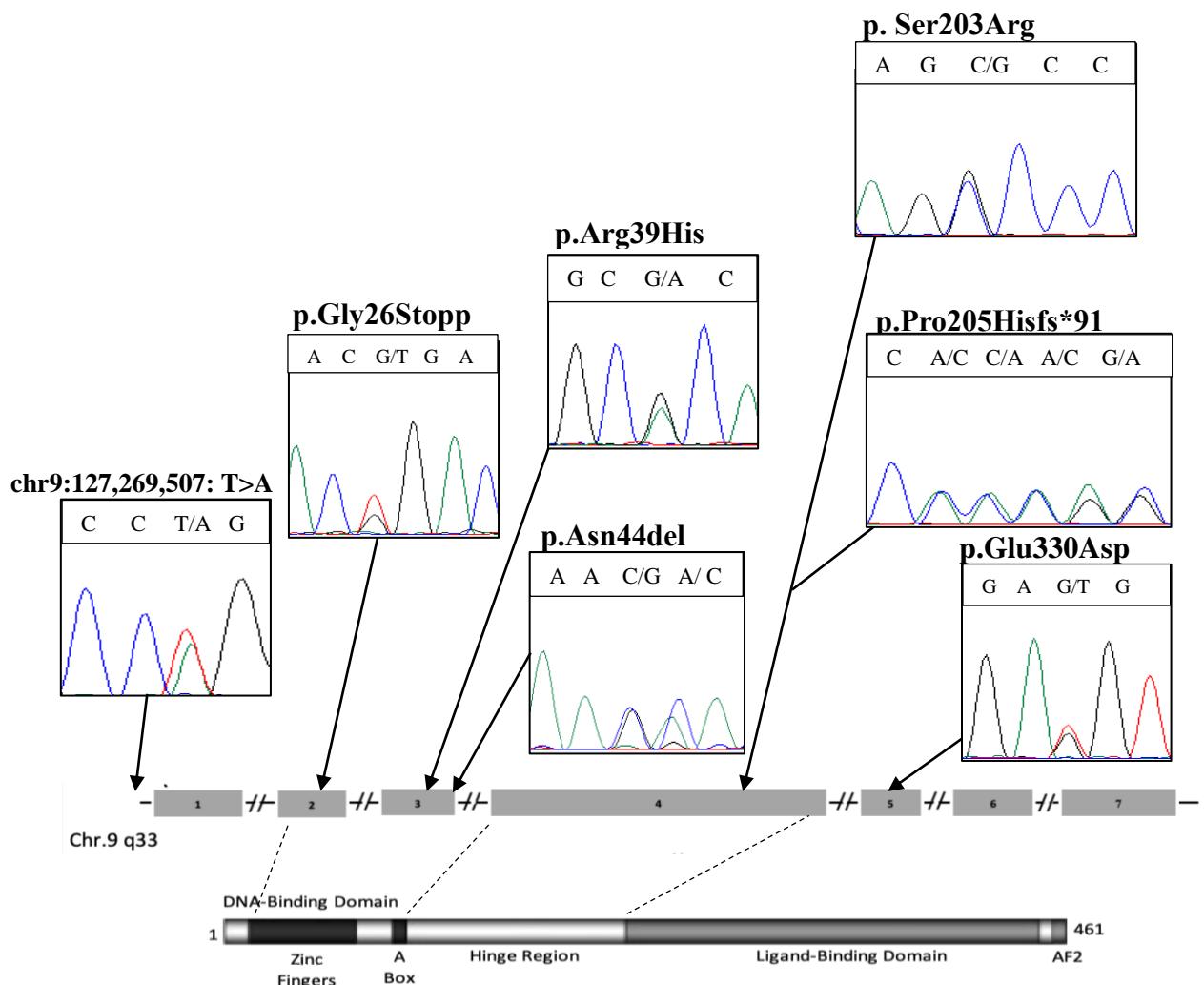


Abbildung 11: Die *NR5A1*-Mutationen und ihre Lokalisation auf dem *NR5A1*-Gen und in den Domänen des SF-1 Proteins. Bei den Mutationen ist zuerst der Wildtyp angegeben und dann die mutierte Sequenz. Zu sehen sind die Sequenzen, die mittels Sanger-Sequenzierung produziert und dann mithilfe des Programms Chromas dargestellt werden konnten. Bei den Patienten GF-161, GF-259, GF-318 wurde eine Exom Sequenzierung per NGS in übergeordneten Arbeiten der Kieler AG Pädiatrische Endokrinologie durchgeführt. Das *NR5A1*-Gen wurde davor im Rahmen der Dissertation mittels der Sanger Sequenzierung durchgeführt und die Elektropherogramme erstellt.

5.5 Liste der Mutationen

Patienten-ID	Bezeichnung der Mutation	Lokalisation (GRCh38/hg38)
GF-259	p.N44del	chr9:124,503,191-124,503,193
GF-257	p.E330D	chr9:124,493,030: G > T
GF-161	p.S203R	chr9:124,500,351: C > G
	p.P205Hisfs*91	chr9:124,500,346
GF-114	p.G26Stop	chr9:124,503,320: G > T
GF-264	p.R39H	chr9:124,503,207: G > A
GF-318	-	chr9:124,507,228: T > A im Intronbereich

5.6 Ethikanträge

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION

28. MÄR. 2011 *Eing*



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus
Klinik für Allgemeine Pädiatric
Endokrinologische Ambulanz
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 9
24105 Kiel

Telefon 0431 / 587-1808
Telefax 0431 / 587-1831

Datum:

16.03.2011

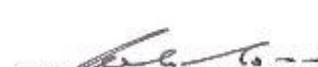
AZ.: D 415/11 (bitte stets angeben)
Studienplan: Androgenresistenz ohne Androgenrezeptorgenmutation:
von der funktionellen Charakterisierung zum Epigenotyp
(in Bezug auf AZ. A 410/08: Investigation of the molecular pathogenesis and patho-physiology of Disorders of Sex Development (DSD) –EuroDSD)
DFG-Sachbeihilfeantrag
Ihr Schreiben vom: 04.03.2011 (Eingang 07.03.2011)

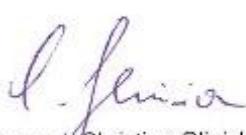
Lieber Herr Holterhus,

vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein.

Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Genehmigter Ethik-Fortsetzungsantrag

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1625

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus
Klinik für Allgemeine Pädiatrie
Endokrinologische Ambulanz
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 9
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel
Telefon: 0431 / 597-1009
Telefax: 0431 / 597-5333
ethik.comm@emai.uni-kiel.de

Datum:

14.1.2014

AZ.: D 401/14

(bitte stets angeben)

DFG-Sachbeihilfeantrag:

Fortsetzungsantrag, Information und Einwilligungserklärung

In Bezug auf:

AZ.: D 415/11

Studienplan:

Androgenresistenz ohne Androgenrezeptorenmutation: von der funktionellen Charakterisierung zum Epigenotyp
(In Bezug auf AZ. A 410/08: Investigation of the molecular pathogenesis and pathophysiology of Disorders of Sex Development (DSD) –EuroDSD)

Ihr Antrag vom: 13.1.2014 (Eingang 14.1.2014)

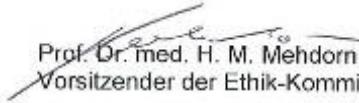
Sehr geehrter Herr Kollege Holterhus,

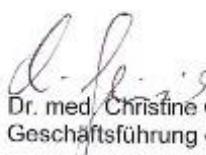
vielen Dank für Ihren obengenannten Antrag zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Fortführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzugeben sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Projektleiter und den an der Studie teilnehmenden Ärzten.
3. Nach Abschluss der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Gilnicke
Geschäftsleitung der Ethik-Kommission

6 Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus aussprechen für die Bereitstellung dieses spannenden Themas und für die stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung.

Vor allem möchte ich meiner Betreuerin Dr. Nadine Hornig danken. Mit keinem Menschen zuvor habe ich so viele E-Mails ausgetauscht. Die zahlreichen Gespräche und Treffen waren für mich sowohl auf intellektueller als auch persönlicher Ebene eine riesige Bereicherung. Eine bessere und intensivere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können. Ihre inspirierenden Vorschläge und persönlichen Worte habe ich immer als sehr anregend und ermutigend empfunden.

Für die Einarbeitung und die schöne Zeit im Labor möchte ich mich bei Brigitte Karwelies, Gila Hohmann und Tanja Stampe bedanken. Ich danke Ihnen für ihre Geduld, ihre Zeit und dafür, dass sie mir mit Rat und Tat in kritischen Momenten zur Seite standen, wenn mal wieder etwas nicht geklappt hat.

Mein persönlich grösster Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen bisherigen Lebensweg und mein Studium ermöglicht haben und mir immer und zu jeder Zeit hilfreich zur Seite stehen. Ich danke auch meinen Bruder Steven, bei dem ich stets viel Verständnis und motivierende Impulse gefunden habe.

Mein spezieller Dank gilt meinen Freundinnen Jeanny und Lore, die mir mit Ratschlägen und der sprachlichen Korrektur dieser Arbeit sowie der Formatierung einen großen Dienst erwiesen haben. Eure kritischen Anmerkungen waren für mich sehr wertvoll und haben diese Arbeit enorm bereichert.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freund Skyler danken, der mich über die Jahre hinweg immer wieder unterstützt und begleitet hat. Ohne dein Verständnis und dein offenes Ohr bei Fragestellungen jeglicher Art wäre diese Arbeit nicht in dieser Form zustande gekommen.

7 Quellenverzeichnis

- [1] I. A. Hughes, C. Houk, S. F. Ahmed, and P. A. Lee, “Consensus statement on management of intersex disorders,” *Archives of Disease in Childhood*, vol. 91, no. 7. BMJ Publishing Group, pp. 554–563, Jul-2006.
- [2] B. B. Mendonca, S. Domenice, I. J. P. Arnhold, and E. M. F. Costa, “46,XY disorders of sex development (DSD),” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 70, no. 2, pp. 173–187, Feb. 2009.
- [3] H. Fabbri-Scallet *et al.*, “Functional characterization of five NR5A1 gene mutations found in patients with 46,XY disorders of sex development,” *Hum. Mutat.*, vol. 39, no. 1, pp. 114–123, Jan. 2018.
- [4] R. Werner *et al.*, “New NR5A1 mutations and phenotypic variations of gonadal dysgenesis,” *PLoS One*, vol. 12, no. 5, pp. 1–18, 2017.
- [5] B. Ferraz-de-Souza, L. Lin, and J. C. Achermann, “Steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and human disease,” *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 336, no. 1–2. pp. 198–205, 10-Apr-2011.
- [6] P.-M. Holterhus, O. Hiort, and J. Schopohl, “Störungen/Besonderheiten der Geschlechtsentwicklung,” in *Klinische Physiologie*, 11., unver., H. E. Blum and D. Müller-Wieland, Eds. Georg Thieme Verlag, 2020.
- [7] N. C. Hornig and P. M. Holterhus, “Molecular basis of androgen insensitivity syndromes,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 523, Mar. 2021.
- [8] J. Y. Wu *et al.*, “A novel NR5A1 variant in an infant with elevated testosterone from an Australasian cohort of 46,XY patients with disorders of sex development,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 78, no. 4, pp. 545–550, Apr. 2013.
- [9] R. Coutant *et al.*, “Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome,” in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2007, vol. 92, no. 8, pp. 2868–2873.
- [10] N. C. Hornig *et al.*, “Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 101, no. 11, pp. 4468–4477, Nov. 2016.
- [11] K. L. Parker, B. P. Schimmer, and A. Schedl, “Genes essential for early events in gonadal development,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 55, no. 7, p. 831, 1999.
- [12] R. Lüllmann-Rauch, *Histologie*, 4. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2012.
- [13] L. Möller, D. Führer-Sakel, M. Reincke, and R. Gärtnert, “Physiologie und allgemeine Pathophysiologie,” H. E. Blum and D. Müller-Wieland, Eds. Georg Thieme Verlag, 2018.
- [14] B. Brand-Saberi and N. Ulfing, “Androgene (Testosteron),” 3., aktual., N. Ulfing and B. Brand-Saberi, Eds. Georg Thieme Verlag, 2017.
- [15] J. Tapanainen, P. Kellokumpu-Lehtinen, L. Pelliniemi, and I. Huhtaniemi, “Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 52, no. 1, pp. 98–102, 1981.
- [16] S. P. Scherrer, D. A. Rice, and L. L. Heckert, “Expression of Steroidogenic Factor 1 in the Testis Requires an Interactive Array of Elements Within Its Proximal Promoter1,” *Biol. Reprod.*, vol. 67, no. 5, pp. 1509–1521, Nov. 2002.
- [17] B. P. Schimmer and P. C. White, “Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 24, no. 7, pp. 1322–1337, Mar. 2010.
- [18] B. Kleine and W. G. Rossmannith, “Hormonphysiologie: Die Gonaden,” in *Hormone und Hormonsysteme*, 2. Auflage., Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, pp. 215–216.
- [19] M. Welsh, H. Suzuki, and G. Yamada, “The masculinization programming window,” *Endocr. Dev.*, vol. 27, pp. 17–27, Jun. 2014.
- [20] J. D. Wilson, F. W. George, and J. E. Griffin, “The hormonal control of sexual development,” *Science (80-)*, vol. 211, no. 4488, pp. 1278–1284, 1981.
- [21] G. Yamada, Y. Satoh, L. S. Baskin, and G. R. Cunha, “Cellular and molecular mechanisms of development of the external genitalia,” *Differentiation*, vol. 71, no. 8. Blackwell Verlag GmbH Berlin, pp. 445–460, 2003.
- [22] P. Holterhus and O. Hiort, “Störungen (Besonderheiten) der Geschlechtsentwicklung,” in *Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*, 4. Auflage., H. Lehnert, Ed. Stuttgart, New York: Thieme, 2014, pp. 398–413.
- [23] R. Gätje *et al.*, *Kurzlehrbuch: Gynäkologie und Geburtshilfe*, 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 2015.
- [24] N. Camats *et al.*, “Ten novel mutations in the NR5A1 gene cause disordered sex development in 46,XY and ovarian insufficiency in 46,XX individuals,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 7, pp. E1294–306, Jul. 2012.

[25] L. Crisponi *et al.*, “The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome.,” *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 2, pp. 159–66, Feb. 2001.

[26] D. Goswami and G. S. Conway, “Premature ovarian failure.,” *Hum. Reprod. Update*, vol. 11, no. 4, pp. 391–410.

[27] P. Philibert *et al.*, “NR5A1 (SF-1) gene variants in a group of 26 young women with XX primary ovarian insufficiency,” *Fertil. Steril.*, vol. 99, no. 2, pp. 484–489, Feb. 2013.

[28] S. Carreau and H. Lejeune, “Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. Second Edition,” *Andrologie*, vol. 11, no. 2, pp. 95–97, Jun. 2001.

[29] J. P. Suntharalingham, F. Buonocore, A. J. Duncan, and J. C. Achermann, “DAX-1 (NR0B1) and steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in human disease,” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 29, no. 4. Bailliere Tindall Ltd, pp. 607–619, 01-Aug-2015.

[30] L. Lin *et al.*, “Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 92, no. 3, pp. 991–9, Mar. 2007.

[31] G. Majdic, “Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity,” *Endocrinology*, vol. 143, no. 2, pp. 607–614, Feb. 2002.

[32] Y. Ikeda, W. Shen, H. Ingraham, and K. Parker, “Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the stero hydroxylases,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 8, no. 5, pp. 654–662, 1994.

[33] J. C. Achermann, M. Ito, M. Ito, P. C. Hindmarsh, and J. L. Jameson, “A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans [1],” *Nature Genetics*, vol. 22, no. 2. Presse Dienstleistungsgesellschaft mbH und Co. KG, pp. 125–126, 1999.

[34] B. Köhler *et al.*, “The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 161, no. 2, pp. 237–242, 2009.

[35] B. Köhler *et al.*, “Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency.,” *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 1, pp. 59–64, Jan. 2008.

[36] L. Lin and J. C. Achermann, “Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development,” in *Sexual Development*, 2008, vol. 2, no. 4–5, pp. 200–209.

[37] F. C. Soardi, F. B. Coeli, A. T. Maciel-Guerra, G. Guerra-Júnior, and M. Palandi de Mello, “Complete XY gonadal dysgenesis due to p.D293N homozygous mutation in the NR5A1 gene: A case study,” *J. Appl. Genet.*, vol. 51, no. 2, pp. 223–224, 2010.

[38] D. Zangen *et al.*, “Testicular differentiation factor SF-1 is required for human spleen development,” *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 5, pp. 2071–2075, 2014.

[39] S. Domenice *et al.*, “Wide spectrum of NR5A1-related phenotypes in 46,XY and 46,XX individuals,” *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, vol. 108, no. 4. John Wiley and Sons Inc., pp. 309–320, 01-Dec-2016.

[40] J. C. Achermann and I. A. Hughes, “Disorders of sex development.,” in *Williams Textbook of Endocrinology*, 12th ed., S. Melmed, K. S. Polonsky, P. R. Larsen, and H. M. Kronenberg, Eds. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011, pp. 863–894.

[41] D. Loureño *et al.*, “Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 360, no. 12, pp. 1200–1210, Mar. 2009.

[42] V. Storch, U. Welsch, and M. Wink, *Evolutionsbiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.

[43] K. Umesono and R. M. Evans, “Determinants of Target Gene Specificity for Steroid/Thyroid Hormone Receptors,” 1969.

[44] R. Werner and P. M. Holterhus, “Androgen action,” *Endocr. Dev.*, vol. 27, pp. 28–40, Jun. 2014.

[45] P. B. Grino, J. E. Griffin, and J. D. Wilson, “Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone,” *Endocrinology*, vol. 126, no. 2, pp. 1165–1172, 1990.

[46] I. A. Hughes, J. D. Davies, T. I. Bunch, V. Pasterski, K. Mastroyannopoulou, and J. MacDougall, “Androgen insensitivity syndrome,” *Lancet*, vol. 380, no. 9851, pp. 1419–1428, Oct. 2012.

[47] A. L. Boehmer *et al.*, “Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome.,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 86, no. 9, pp. 4151–60, Sep. 2001.

[48] N. P. Mongan, R. Tadokoro-Cuccaro, T. Bunch, and I. A. Hughes, “Androgen insensitivity syndrome,” *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 29, no. 4, pp. 569–580, Aug. 2015.

[49] S. F. Ahmed, A. Bashamboo, A. Lucas-Herald, and K. McElreavey, “Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD,” *British Medical Bulletin*, vol. 106, no. 1. Br Med Bull, pp. 67–89, Jun-2013.

[50] National Institutes of Health, “Androgen insensitivity syndrome.” [Online]. Available: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/androgen-insensitivity-syndrome#sourcesforpage>. [Accessed: 24-Sep-2020].

[51] A. Deeb, C. Mason, Y. S. Lee, and I. A. Hughes, “Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 63, no. 1, pp. 56–62, Jul. 2005.

[52] P.-M. Holterhus, G. H. G. Sinnecker, and O. Hiort, “Phenotypic Diversity and Testosterone-Induced Normalization of Mutant L712F Androgen Receptor Function in a Kindred with Androgen Insensitivity*,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 9, pp. 3245–3250, Sep. 2000.

[53] P. M. Holterhus *et al.*, “Clinical and molecular spectrum of somatic mosaicism in androgen insensitivity syndrome,” *Pediatr. Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 684–690, 1999.

[54] L. Jukier, M. Kaufman, L. Pinsky, and R. E. Peterson, “Partial androgen resistance associated with secondary 5 β -reductase deficiency: Identification of a novel qualitative androgen receptor defect and clinical implications,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 59, no. 4, pp. 679–688, 1984.

[55] N. Camats, C. E. Flück, and L. Audi, “Oligogenic Origin of Differences of Sex Development in Humans,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 5, p. 1809, Mar. 2020.

[56] I. A. Hughes and A. Deeb, “Androgen resistance,” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 20, no. 4. Baillière Tindall, pp. 577–598, 01-Dec-2006.

[57] I. A. Hughes, B. A. J. Evans, R. Ismail, and J. Matthews, “Complete androgen insensitivity syndrome characterized by increased concentration of a normal androgen receptor in genital skin fibroblasts,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 63, no. 2, pp. 309–315, 1986.

[58] M. Appari *et al.*, “Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome,” *J. Mol. Med.*, vol. 87, no. 6, pp. 623–632, Jun. 2009.

[59] K. R. Chng *et al.*, “A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers,” *EMBO J.*, vol. 31, no. 12, pp. 2810–2823, Jun. 2012.

[60] G. H. Sinnecker, O. Hiort, E. M. Nitsche, P. M. Holterhus, and K. Kruse, “Functional assessment and clinical classification of androgen sensitivity in patients with mutations of the androgen receptor gene. German Collaborative Intersex Study Group,” *Eur J Pediatr.*, vol. 156, no. 1, pp. 7–14, 1997.

[61] “Androgenresistenzsyndrome - Klinische und molekulare Grundlagen.” [Online]. Available: <https://www.aerzteblatt.de/archiv/16087/Androgenresistenzsyndrome-Klinische-und-molekulare-Grundlagen>. [Accessed: 27-Oct-2019].

[62] R. Netzker, *Duale Reihe Biochemie*, 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2008.

[63] J. Bell, “The polymerase chain reaction,” *Immunol. Today*, vol. 10, no. 10, pp. 351–355, Oct. 1989.

[64] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson, “DNA sequencing with chain-terminating inhibitors,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, Dec. 1977.

[65] K. Kretz, W. Callen, and V. Hedden, “Manual Supplement Cycle Sequencing,” *Genome Res.*, vol. 3, pp. S107–S112, 1994.

[66] J. Guo *et al.*, “Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 27, pp. 9145–9150, Jul. 2008.

[67] L. M. Smith *et al.*, “Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis,” *Nature*, vol. 321, no. 6071, pp. 674–679, Jun. 1986.

[68] P. C. Ng and S. Henikoff, “SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function.,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3812–4, Jul. 2003.

[69] I. Adzhubei, D. M. Jordan, and S. R. Sunyaev, “Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2,” *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, vol. 76, no. 1, pp. 7.20.1-7.20.41, Jan. 2013.

[70] W. McLaren *et al.*, “The Ensembl Variant Effect Predictor,” *Genome Biol.*, vol. 17, no. 1, p. 122, Dec. 2016.

[71] P. Rentzsch, D. Witten, G. M. Cooper, J. Shendure, and M. Kircher, “CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, no. D1, pp. D886–D894, Jan. 2019.

[72] I. Dunham *et al.*, “An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome,” *Nature*, vol. 489, no. 7414, pp. 57–74, Sep. 2012.

[73] B. Yu *et al.*, “Novel NR5A1 mutations found in Chinese patients with 46, XY disorders of sex development,” *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 89, no. 5, pp. 613–620, Nov. 2018.

[74] K. W. Feldman and D. W. Smith, “Fetal phallic growth and penile standards for newborn male infants,” *J. Pediatr.*, vol. 86, no. 3, pp. 395–398, 1975.

[75] W. JS, F. C, and R. FI, “Sex steroid production by the human fetus: its role in morphogenesis and control by gonadotropins,” *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, vol. 13, no. 2, pp. 41–58, 1977.

[76] N. Camats *et al.*, “Ten Novel Mutations in the NR5A1 Gene Cause Disordered Sex Development in 46,XY and

Ovarian Insufficiency in 46,XX Individuals," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, no. 7, pp. E1294–E1306, Jul. 2012.

[77] J. S. Jorgensen and J. H. Nilson, "AR Suppresses Transcription of the LH β Subunit by Interacting with Steroidogenic Factor-1," *Mol. Endocrinol.*, vol. 15, no. 9, pp. 1505–1516, Sep. 2001.

[78] D. J. van de Wijngaart, H. J. Dubbink, M. E. van Royen, J. Trapman, and G. Jenster, "Androgen receptor coregulators: Recruitment via the coactivator binding groove," *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 352, no. 1–2, pp. 57–69, 16-Apr-2012.

[79] C. C. Quirk, K. L. Lozada, R. A. Keri, and J. H. Nilson, "A Single Pitx1 Binding Site Is Essential for Activity of the LH β Promoter in Transgenic Mice," *Mol. Endocrinol.*, vol. 15, no. 5, pp. 734–746, May 2001.

[80] U. B. Kaiser, L. M. Halvorson, and M. T. Chen, "Sp1, Steroidogenic Factor 1 (SF-1), and Early Growth Response Protein 1 (Egr-1) Binding Sites Form a Tripartite Gonadotropin-Releasing Hormone Response Element in the Rat Luteinizing Hormone- β Gene Promoter: an Integral Role for SF-1," *Mol. Endocrinol.*, vol. 14, no. 8, pp. 1235–1245, Aug. 2000.

[81] K. L. Parker and B. P. Schimmer, "Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function," *Endocrine Reviews*, vol. 18, no. 3. Endocrine Society, pp. 361–377, 1997.

[82] T. H. Little *et al.*, "Sequence-specific deoxyribonucleic acid (DNA) recognition by steroidogenic factor 1: A helix at the carboxy terminus of the DNA binding domain is necessary for complex stability," *Mol. Endocrinol.*, vol. 20, no. 4, pp. 831–843, Apr. 2006.

[83] P. Philibert *et al.*, "Steroidogenic factor-1 (SF-1) gene mutation as a frequent cause of primary amenorrhea in 46,XY female adolescents with low testosterone concentration," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, vol. 8, Mar. 2010.

[84] M. M. Grumbach, "Commentary: A window of opportunity: The diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 5. J Clin Endocrinol Metab, pp. 3122–3127, May-2005.

[85] M. Zitzmann, "Male hypogonadism and infertility," *Gynakologische Endokrinologie*, vol. 17, no. 4. Springer Verlag, pp. 230–235, 01-Oct-2019.

[86] L. M. Halvorson, U. B. Kaiser, and W. W. Chin, "Stimulation of luteinizing hormone β gene promoter activity by the orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 12, pp. 6645–6650, Mar. 1996.

[87] D. L. Duval, S. E. Nelson, and C. M. Clay, "A binding site for steroidogenic factor-1 is part of a complex enhancer that mediates expression of the murine gonadotropin-releasing hormone receptor gene," *Biol. Reprod.*, vol. 56, no. 1, pp. 160–168, Jan. 1997.

[88] S. B. R. Jacobs, D. Coss, S. M. McGillivray, and P. L. Mellon, "Nuclear factor Y and steroidogenic factor 1 physically and functionally interact to contribute to cell-specific expression of the mouse follicle-stimulating hormone- β gene," *Mol. Endocrinol.*, vol. 17, no. 8, pp. 1470–1483, Aug. 2003.

[89] L. Zhao *et al.*, "Tissue-specific knockouts of steroidogenic factor 1," in *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2004, vol. 215, no. 1–2, pp. 89–94.

[90] J.-H. Choi, K. H. Woo, J. H. Kim, J. H. Cho, G.-H. Kim, and H.-W. Yoo, "Novel heterozygous mutations of the SF1 gene and their functional characterization in patients with 46,XY disorders of sex development (DSD) without adrenal insufficiency," *Int. J. Pediatr. Endocrinol.*, vol. 2015, no. S1, Dec. 2015.

[91] M. Robinow, F. N. Silverman, and H. D. Smith, "A Newly Recognized Dwarfing Syndrome," *Am. J. Dis. Child.*, vol. 117, no. 6, pp. 645–651, 1969.

[92] P. M. Holterhus *et al.*, "Intrinsic androgen-dependent gene expression patterns revealed by comparison of genital fibroblasts from normal males and individuals with complete and partial androgen insensitivity syndrome," *BMC Genomics*, vol. 8, no. 1, p. 376, Oct. 2007.

[93] P. A. Lee, C. J. Migeon, T. R. Brown, and M. Robinow, "Robinow's syndrome. Partial primary hypogonadism in pubertal boys, with persistence of micropenis.," *Am. J. Dis. Child.*, vol. 136, no. 4, pp. 327–30, Apr. 1982.

[94] A. R. La Spada, E. M. Wilson, D. B. Lubahn, A. E. Harding, and K. H. Fischbeck, "Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy," *Nat. 1991 3526330*, vol. 352, no. 6330, pp. 77–79, 1991.

[95] M. Breza and G. Koutsis, "Kennedy's disease (spinal and bulbar muscular atrophy): a clinically oriented review of a rare disease," *J. Neurol. 2018 2663*, vol. 266, no. 3, pp. 565–573, Jul. 2018.

[96] H. AE, T. PK, B. M, B. PG, M.-H. JA, and P. JR, "X-linked recessive bulbospinal neuropathy: a report of ten cases," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 45, no. 11, pp. 1012–1019, 1982.

[97] K. G, B. M, K. W, Y. P, O. C, and S. F, "[X-chromosomal recessive spinobulbar muscular atrophy (Kennedy type). Description of a family, clinical aspects, molecular genetics, differential diagnosis and therapy]," *Nervenarzt*, vol. 69, no. 8, pp. 660–665, 1998.

[98] K. Munk, D. Jahn, M. Jahn, I. Kronberg, and T. Langer, *Genetik*, 2. Auflage. Thieme, 2017.

[99] F. WuQiang *et al.*, “Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 311, no. 4, pp. 987–994, Nov. 2003.

[100] Y. Wada, M. Okada, T. Hasegawa, and T. Ogata, “Association of severe micropenis with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1,” *Endocr. J.*, vol. 52, no. 4, pp. 445–448, 2005.

[101] A. Ferlin, M. S. Rocca, C. Vinanzi, M. Ghezzi, A. Di Nisio, and C. Foresta, “Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations,” 2015.

[102] M. M. Garner and A. Revzin, “A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: Application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 9, no. 13, pp. 3047–3060, Jul. 1981.

[103] “Current protocols in molecular biology, edited by M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. Volumes 1 and 2. John Wiley & Sons, Inc., Media, PA, 1988, \$165.00,” *Mol. Reprod. Dev.*, vol. 1, no. 2, pp. 146–146, 1989.

[104] M. G. Fried, “Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay,” *Electrophoresis*, vol. 10, no. 5–6, pp. 366–376, 1989.

[105] S. T. Smale, “Luciferase assay,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 5, no. 5, May 2010.

[106] V. Orlando, “Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation,” *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 25, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 99–104, 01-Mar-2000.

[107] A. S. Weinmann and P. J. Farnham, “Identification of unknown target genes of human transcription factors using chromatin immunoprecipitation,” *Methods*, vol. 26, no. 1, pp. 37–47, Jan. 2002.

[108] D. M. Warman *et al.*, “Three New SF-1 <i>(NR5A1) </i>Gene Mutations in Two Unrelated Families with Multiple Affected Members: Within-Family Variability in 46,XY Subjects and Low Ovarian Reserve in Fertile 46,XX Subjects,” *Horm. Res. Paediatr.*, vol. 75, no. 1, pp. 70–77, 2011.

[109] C. E. Flück *et al.*, “Broad Phenotypes of Disorders/Differences of Sex Development in MAMLD1 Patients Through Oligogenic Disease,” *Front. Genet.*, vol. 10, p. 746, Aug. 2019.

[110] N. Camats, M. Fernández-Cancio, L. Audí, A. Schaller, and C. E. Flück, “Broad phenotypes in heterozygous NR5A1 46,XY patients with a disorder of sex development: an oligogenic origin?,” *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 26, no. 9, pp. 1329–1338, Sep. 2018.

[111] C.-J. Partsch, P.-M. Holterhus, W. G. Sippell, and H. Mönig, *Endokrinologische Funktionsdiagnostik 6. überarbeitete Auflage*, 7. überarb. Kiel: Schmidt & Klaunig, 2011.

8 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1:	2
ABBILDUNG 2:	4
ABBILDUNG 3:	8
ABBILDUNG 4:	10
ABBILDUNG 5:	14
ABBILDUNG 6:	30
ABBILDUNG 7:	35
ABBILDUNG 8:	35
ABBILDUNG 9:	36
ABBILDUNG 10:	55
ABBILDUNG 11:	56

9 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1:	17
TABELLE 2:	19
TABELLE 3:	29
TABELLE 4:	36

