

**Analyse des Mutationsspektrums bei 46,XY
Differences of Sex Development**

**Nachweis der endocytotischen Rezeptoren LRP2 und
LMBR1L sowie des Gens *KISS1***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Hannah Lea Marko

aus Bonn

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schweizer
2. Gutachter: PD Dr. med. Felix Florian Schreiner

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.12.2022

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Becker

Für meine Eltern,

die mich immer unterstützt und mir alles ermöglicht haben

und für Martin,

den besten kleinen Bruder.

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	12
1.	Einleitung	14
1.1	Unterschiede der Geschlechtsentwicklung	14
1.2	Entwicklung der männlichen Genitalorgane	15
1.3	Das Regulations- und Steuerungshormonsystem von Hypothalamus und Hypophyse	17
1.4	Androgene, Testosteronsynthese und -wirkung	18
1.5	SHBG (Sexualhormonbindungsprotein)	19
1.6	Androgeninsensitivitätssyndrome (AIS)	20
1.6.1	Komplettes Androgeninsensitivitätssyndrom	20
1.6.2	Partielles Androgeninsensitivitätssyndrom	21
1.6.3	Mildes/minimales Androgeninsensitivitätssyndrom	21
1.6.4	Der Androgenrezeptor	22
1.6.5	Androgenrezeptormutationen	22
1.7	Hormontransport	23
1.7.1	Hormontransporthypothesen	23
1.7.2	Steroidtransport über ein Membrantransportprotein in Drosophila	23
1.7.3	Zelluläre Aufnahme sulfatierter Steroide	24
1.7.4	Das endocytotische Transportprotein Megalin (LRP2)	25
1.7.5	Megalinexpression und -funktion	26
1.7.6	Autosomal-rezessive <i>LRP2</i> -Mutationen verursachen das Donnai-Barrow-Syndrom	26
1.7.7	Ein <i>Lrp2</i> -Knockout Mausmodell zeigt beeinträchtigte Sexualsteroidwirkung	27
1.8	Hintergrund und Ausgangsbasis dieser Arbeit	27
1.9	Erkenntnisse über Schilddrüsenhormone und mögliche Relevanz für Steroide	30
1.10	Fragestellung und Zielsetzung	32
2.	Material und Methoden	33
2.1	Fibroblastensammlung: Auswahl zu analysierender DSD-Fälle	33

2.2	Substanzen und Materialien, Kits, Geräte, Programme	34
2.3	Zelllinien	36
2.3.1	Genitalhautfibroblasten	36
2.3.2	HAP1-Zellen	36
2.3.3	HEK293 (Human Embryonic Kidney, menschliche embryonale Nierenzellen) -Zellen	37
2.4	Zellkultur	37
2.4.1	Zellkulturmedien	37
2.4.2	Kultivierung von Zellen	37
2.4.3	Auftauen und Wegfrieren von Zellen	38
2.4.4	Behandlung von Zellen mit Dihydrotestosteron	38
2.4.5	Zellernte	39
2.4.6	Transiente Transfektion von HEK293- und HAP1-Zellen	39
2.5	Exomsequenzierung	40
2.5.1	Isolierung genomischer DNA (gDNA)	40
2.5.2	Analyse der Exomsequenzierung	40
2.5.2.1	Mutationsanalyse: Allelfrequenzen und Pathogenität	41
2.5.3	Mutationsnachweis in gDNA und mRNA/cDNA mittels Sangersequenzierung	42
2.5.3.1	Amplifikation genomischer DNA, DNA-Gelextraktion	42
2.5.3.2	Isolation von RNA	44
2.5.3.2.1	cDNA-Synthese: cDNA für Sequenzierungen	44
2.5.3.2.2	cDNA Amplifikation, Gelelektrophorese und Gelextraktion	44
2.5.3.3	Sequenzierung	45
2.6	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	45
2.6.1	cDNA-Synthese: cDNA zur Analyse mittels qRT-PCR	45
2.6.2	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	46
2.7	Klonierung des Lipocalinrezeptors 1	47
2.7.1	Verwendete Puffer	47
2.7.2	Klonierung UTR (untranslatierte Region) - <i>LMBR1L</i> -pGEM [®] -T Easy	47
2.7.2.1	PCR, A-Tailing und Ligation	48
2.7.2.2	Hitzeschock-Transformation kompetenter <i>E. coli</i> XL1- Blue	49

2.7.2.3	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Präp)	49
2.7.2.4	Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Sequenzierung	49
2.7.3	Klonierung <i>HA-LMBR1L</i> -pGEM [®] -T Easy und <i>LMBR1L-HA</i> -pGEM [®] -T Easy	50
2.7.4	Klonierung <i>HA-LMBR1L</i> -pcDNA3 und <i>LMBR1L-HA</i> -pcDNA3	51
2.7.4.1	Retransformation und Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp)	52
2.8	Mutagenese des Lipocalinrezeptors 1	53
2.8.1	Hitzeschock-Transformation in <i>E. coli</i> XL10-Gold	53
2.9	Proteinbiochemische Methoden	54
2.9.1	Proteinbiochemische Methoden: Verwendete Puffer und Lösungen	54
2.9.2	Verwendete Antikörper	55
2.9.3	Isolation von Protein	55
2.9.4	Proteinbestimmung	55
2.9.5	SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)	56
2.9.6	Proteintransfer	57
2.9.6.1	Semi-Dry-Blot und Immundetektion	57
2.9.6.2	Proteintransfer durch Nass-Blot	57
2.9.7	Oberflächenbiotinylierung	58
2.10	Statistische Analyse	58
3.	Ergebnisse	60
3.1	Übersicht über die nachgewiesenen Genmutationen und die zugehörigen DSD-Fälle	60
3.2	Ein CAIS-Fall mit Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des <i>AR</i>	64
3.3	Ein CAIS-Fall mit Mutation in der DNA-Bindungsdomäne des <i>AR</i>	65
3.4	Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen <i>MAP3K1</i>	66
3.5	Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen <i>WWOX</i>	67
3.6	Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutationen in den Genen <i>MAMLD1</i> und <i>MAP3K1</i>	69

3.7	Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutationen in den Genen <i>HSD17B3</i> und <i>ZFPM2</i>	71
3.8	Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen <i>KISS1</i>	73
3.9	Mutationen im endocytotischen Rezeptor <i>LRP2/Megalin</i>	74
3.9.1	Fall 8 zeigt drei heterozygote Mutationen in <i>LRP2</i>	74
3.9.2	Fall 9 zeigt eine heterozygote Mutation in <i>LRP2</i>	75
3.9.3	<i>LRP2</i> -Mutationen reduzieren die <i>LRP2</i> -Proteinexpression	78
3.10	Mutationen im endocytotischen Rezeptor <i>LMBR1L</i> /Lipocalin-rezeptor 1	81
3.10.1	Fall 10 zeigt eine heterozygote Mutation im Gen <i>LMBR1L</i>	81
3.10.2	Fall 11 zeigt eine heterozygote Mutation im Gen <i>LMBR1L</i>	81
3.10.3	Fall 6 zeigt zusätzlich eine heterozygote Mutation im Gen <i>LMBR1L</i>	82
3.10.4	In der <i>LMBR1L</i> cDNA sind p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val heterozygot nachweisbar	84
3.10.5	<i>LMBR1L</i> -Mutationen beeinflussen die <i>LMBR1L</i> -mRNA-Spiegel	85
3.10.6	DHT-Stimulation der Fibroblasten kann die <i>LMBR1L</i> -mRNA-Expression anheben	87
3.10.7	Auswirkung von <i>LMBR1L</i> -Mutationen auf die Oberflächenexpression des Rezeptors	90
3.10.7.1	Expression von <i>LMBR1L</i> mit HA-Tag in HEK293-Zellen	90
3.10.7.2	Expression von <i>LMBR1L</i> mit HA-Tag in HAP1- <i>LMBR1L</i> -Knockout-Zellen	91
3.10.7.3	<i>LMBR1L</i> -Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val sind an der Oberfläche von transient transfizierten HAP1- <i>LMBR1L</i> -Knockout-Zellen vermindert nachweisbar	92
3.10.7.4	<i>LMBR1L</i> -Proteinexpression ist in Fibroblasten der DSD-Fälle 10 und 11 reduziert	94
3.10.7.5	<i>LMBR1L</i> ist in der Fibroblastenzellmembran der DSD-Fälle 6, 10 und 11 reduziert	94
3.10.7.6	Quantifizierung der 40 kDa-Bande der Western Blots	95
4.	Diskussion	98

4.1	Der CAIS bei Fall 1 liegt eine <i>AR</i> -Mutation in der LBD (p.Arg856Cys) zugrunde	98
4.2	Der CAIS bei Fall 2 liegt eine <i>AR</i> -Mutation in der DBD (p.Arg616His) zugrunde	99
4.3	Diskussion der Ergebnisse des APOD Assay für Fall 1 und 2	100
4.4	Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 3 liegt eine <i>MAP3K1</i> -Mutation (p.Arg339Gln) zugrunde	101
4.4.1	Physiologische Funktion und mutationsbedingte Funktionsänderung von <i>MAP3K1</i>	101
4.4.2	<i>MAP3K1</i> als DSD-Gen	101
4.4.3	Phänotypische Ausprägung von <i>MAP3K1</i> -Mutationen aus Fallbeschreibungen	102
4.4.4	Bei Fall 3 zeigen Anamnese und Phänotyp Charakteristika einer <i>MAP3K1</i> -Mutation	102
4.5	Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 4 liegt eine <i>WWOX</i> -Mutation (p.Thr339Ser) zugrunde	103
4.5.1	Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens <i>WWOX</i>	103
4.5.2	<i>Wwox</i> -Mausmodelle	104
4.5.3	Fall 4 stellt einen der wenigen 46,XY DSD-Fälle mit <i>WWOX</i> -Mutation dar	104
4.6	Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 5 liegen Mutationen in <i>MAMLD1</i> (p.Arg7Gln) und/oder <i>MAP3K1</i> (p.Thr125Ser) zugrunde	105
4.6.1	Physiologische Funktion des Gens <i>MAMLD1</i>	105
4.6.2	<i>Mamld1</i> -Knockout Mausmodell	105
4.6.3	<i>MAMLD1</i> -Mutationen als Ursache für DSD beim Menschen	106
4.6.4	Bei Fall 5 ist eine oligogene DSD Entstehung möglich	106
4.6.5	Diskussion der Testosteronwerte für Fall 5	107
4.6.6	Diskussion des Ergebnisses des APOD Assay für Fall 5	108
4.7	Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 6 liegen Mutationen in <i>HSD17B3</i> (p.0?) und <i>ZFPM2</i> (p.His320Arg) zugrunde	108
4.7.1	Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens <i>HSD17B3</i>	108

4.7.2	Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens <i>ZFPM2</i>	109
4.7.3	<i>Zfpm2</i> -Knockout im Mausmodell	109
4.7.4	Pathophysiologie der <i>ZFPM2</i> -Mutationen von DSD-Individuen	109
4.7.5	Bei Fall 6 finden sich in zwei DSD-assoziierten Genen Mutationen	109
4.8	Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 7 liegt eine Mutation in <i>KISS1</i> (p.Pro95Ser) zugrunde	112
4.8.1	Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens <i>KISS1</i>	112
4.8.2	<i>Kiss1</i> -Knockout Mausmodell	112
4.8.3	Fall 7 ist der erste 46,XY DSD-Fall mit Mutation in <i>KISS1</i>	113
4.8.3.1	Diskussion der Hormonwerte von Fall 7	113
4.8.3.2	Diskussion der Bedeutung der <i>KISS1</i> -Mutation p.Pro95Ser	115
4.8.4	Fallbeschreibungen mit Mutationen im Kisspeptinrezeptor <i>KISS1R</i>	115
4.9	Genmutationen in endocytotischen Rezeptoren kommen bei DSD-Fällen vor	117
4.9.1	Endocytose als zielgerichteter Substanztransport	117
4.9.2	Nachweis von LRP2	117
4.9.3	<i>LRP2</i> -Mutationen verursachen Mittelliniendefekte	118
4.9.4	Heterozygote Mutationen im Gen <i>LRP2</i> sind bei DSD-Phänotypen zu finden	118
4.9.5	Vergleich der Hormonwerte von Fall 8 und Fall 9 mit Referenzwerten	122
4.10	Der Lipocalinrezeptor 1 (<i>LMBR1L</i>)	122
4.10.1	<i>LMBR1L</i> -Funktion	123
4.10.2	<i>LMBR1L</i> als möglicher neuer Rezeptor der endocytotischen Hormonaufnahme	124
4.10.3	Vergleich der Hormonwerte von Fall 10 und Fall 11 mit Referenzwerten	126
4.10.4	Die <i>LMBR1L</i> -Mutationen von Fall 10 und Fall 11 wirken sich auf mRNA-Ebene aus	127
4.10.5	Nachweis des <i>LMBR1L</i>	127
4.10.6	<i>LMBR1L</i> -Mutanten beeinträchtigen die Protein- und/oder Membranexpression	128

4.10.7	<i>LMBR1L</i> -Mutationen könnten die Sexualsteroid-Aufnahme beeinträchtigen	129
4.10.8	DHT-Stimulation beeinflusst die <i>LMBR1L</i> -mRNA-Level	130
4.11	<i>LRP2</i> und <i>LMBR1L</i> können neue Gene für DSD darstellen	135
4.12	Liste DSD-assoziiierter Gene	137
5.	Zusammenfassung	138
6.	Abbildungsverzeichnis	139
7.	Tabellenverzeichnis	141
8.	Literaturverzeichnis	144
9.	Danksagung	169

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium-Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Serumalbumin, Rind
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetales Rinderserum
Fw	forward
gDNA	genomische DNA
G _q	G _q -Protein
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HRP	Horseradish peroxidase
IMDM	Isocove's Modified Dulbecco's Medium
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
m	Maus
MEM	Minimal essential Medium
mRNA	messenger-RNA
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
rb	Kaninchen (rabbit)
Rv	reverse
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered-saline
TE	Tris-EDTA

Ein kursiv geschriebenes Gensymbol bezeichnet das Gen, das nicht kursiv geschriebene Gensymbol das Protein. Menschliche Gene/Proteine werden mit Großbuchstaben und Gene/Proteine anderer Spezies mit großem Anfangsbuchstaben, dann weiter mit Kleinbuchstaben dargestellt. Für Aminosäuren werden Einbuchstabencode und Dreibuchstabencode verwendet. Für chemische Substanzen werden die Elementbezeichnungen des Periodensystems der Elemente verwendet.

1. Einleitung

In dieser Dissertationsschrift vorgestellte Inhalte wurden anteilig in der Publikation „Genomic variants reducing expression of two endocytic receptors in 46,XY differences of sex development“ vom 03.01.2022, Human Mutation (Wiley), veröffentlicht (Marko et al., 2022). Die Autorin dieser Dissertationsschrift ist Erstautorin der Publikation. Die Publikation wurden anhand der Dissertationsschrift verfasst. Inhalte dieser Arbeit finden sich somit auch in der Publikation. Es wird im nachfolgenden Text auf eine Zitierung verzichtet. Zusätzlich wurden Anteile dieser Dissertationsschrift am Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (03. bis 05. März 2021, Berlin/virtuell) mittels virtueller Posterpräsentation sowie wissenschaftlichem Vortrag durch die Autorin dieser Dissertationsschrift vorgestellt. (Siehe auch Seite 170).

1.1 Unterschiede der Geschlechtsentwicklung

Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Lebewesen beschäftigen seit jeher verschiedenste Wissenschaften. Medizinisch-naturwissenschaftliche Erkenntnisse über Beginn und Verlauf der Geschlechtsentwicklung bieten Einblicke in die menschliche Entwicklungsbiologie. Hier stellt die Ausbildung der Gonaden (Hoden/Ovarien) einen grundlegenden Prozess für die morphologische und phänotypische Entwicklung männlicher und weiblicher Charakteristika dar (Wilhelm et al., 2007). In der frühen Embryonalphase kann morphologisch nicht zwischen männlich und weiblich unterschieden werden (Wilhelm und Koopman, 2006). Stattdessen bildet eine einheitlich ausgebildete Struktur die Grundlage der Gonadenentwicklung (Wilhelm und Koopman, 2006). Diese identische Ausgangsstruktur differenziert sich im Verlauf in eine männliche oder in eine weibliche Richtung (Wilhelm und Koopman, 2006). Irreguläre Abläufe während diesem Prozess können die Ausbildung der Gonaden sowie nachfolgend die Entwicklung der Genitalorgane beeinflussen (Wilhelm und Koopman, 2006). Auffälligkeiten der Geschlechtsorgane kommen bei 4,6 von 1000 Neugeborenen vor (Ahmed et al., 2004). Fehlende Übereinstimmung von chromosomalem, gonadalem und anatomischem Geschlecht werden als Unterschiede der Geschlechtsentwicklung („Differences of Sex Development“), DSD (Audi et al., 2018 und Hughes et al., 2006), bezeichnet. In 20 % der als DSD klassifizierten Fälle (Hughes et al., 2006) bis in circa 40 % für die DSD-Untergruppe 46,XY

DSD (Eggers et al., 2016) wird eine molekulargenetische Ursache gefunden. Kennt man an DSD beteiligte Gene, können molekulare Mechanismen der Geschlechtsentwicklung aufgedeckt und ihre Zusammenhänge zur DSD-Ausprägung dargestellt werden (Ahmed et al., 2013). Bei DSD ist eine heterogene klinische Präsentation ohne eindeutige Korrelation von Genotyp und phänotypischer Charakteristik beschrieben, sodass sich Mutationen in einem DSD-assoziierten Gen in ihrer jeweiligen phänotypischen Ausprägung unterscheiden können (Ahmed et al., 2013 und Eggers et al., 2016). Dies zeigt die Komplexität der Faktoren, die in Differenzierungsprozessen, Signalwegen und Regulationsabläufen der Geschlechtsentwicklung zusammenwirken (Wilhelm et al., 2007). Zugleich verdeutlicht dies, dass von einem klinischen Bild nicht auf zugrunde liegende genetische Ursachen rückgeschlossen werden kann (Eggers et al., 2016). Hier liegt - sofern gewünscht - die Bedeutung einer molekulargenetischen Diagnostik bei Menschen mit DSD (Ahmed et al., 2013 und Eggers et al., 2016). Nachgewiesene Genmutationen unterstützen die Betreuung betroffener Personen sowie deren Familie, um mutationsbedingte Unterschiede der Geschlechtsentwicklung zu verstehen und um Entwicklung und Verlauf einordnen zu können (Ahmed et al., 2013 und Eggers et al., 2016).

1.2 Entwicklung der männlichen Genitalorgane

Genetisch festgelegt ist das Geschlecht eines Embryos durch die jeweiligen Geschlechtschromosomen zum Zeitpunkt der Befruchtung (Wilhelm et al., 2007). In der frühen Embryonalentwicklung wird im genetisch männlichen (Karyotyp 46,XY) wie im genetisch weiblichen (Karyotyp 46,XX) Embryo eine als indifferente Gonadenanlage bezeichnete Struktur gebildet, die keine morphologische Zuordnung von männlich oder weiblich erlaubt (Wilhelm und Koopman, 2006). Je nach genetischem Geschlecht beginnt aus der indifferenten Gonadenanlage die Entwicklung von männlichen oder weiblichen Gonaden und im weiteren Verlauf entwickeln sich männliche oder weibliche Genitalorgane (Wilhelm und Koopman, 2006 und Wilhelm et al., 2007). Dieser Prozess besteht aus den aufeinanderfolgenden Phasen Geschlechtsdetermination und Geschlechtsdifferenzierung (Eid und Biason-Lauber, 2016). Im ersten Abschnitt, der Geschlechtsdetermination, entwickelt sich die indifferente Gonadenanlage zu männlichen (Hoden/Testes) oder weiblichen (Eierstöcke/Ovarien) Gonaden (Eid und Biason-Lauber, 2016). Voraussetzung für die männliche Entwicklung ist das Vorhandensein und die intakte Funktion des Gens *SRY*

(sex determining region of Y), das sich auf dem Y-Chromosom befindet und für den Transkriptionsfaktor Hoden-determinierender Faktor (testis determining factor, TDF) codiert (Berta et al., 1990 und Gubbay et al., 1990 und Sinclair et al., 1990). Chromosomale Veränderungen, bei denen *SRY* außerhalb des regulären männlichen Karyotyps vorkommt, verdeutlichen die richtungsweisende Rolle von *SRY* für die männliche Geschlechtsentwicklung: Ist *SRY* irregulär bei Individuen mit weiblichem Karyotyp 46,XX vorhanden, wird die männliche Entwicklungsrichtung initiiert (Berkovitz et al., 1992 und Koopman et al., 1991 und Nakagome et al., 1991). Demgegenüber kann *SRY* im männlichen Karyotyp 46,XY durch Y-chromosomale Veränderungen fehlen oder Mutationen aufweisen: Verlust, Funktionseinschränkung sowie Funktionslosigkeit des *SRY*-Gens können zu einer weiblichen Entwicklungsrichtung führen (Baldazzi et al., 2003 und Jäger et al., 1990 und Levilliers et al., 1989). Über das *SRY*-Genprodukt TDF wird die Differenzierung von Sertoli-Zellen initiiert (Burgoyne et al., 1988). Vermutet wird, dass diese nachfolgend auf die Entwicklung der übrigen Zelltypen des Hodens (Leydig-Zellen, perimyotubuläre Zellen, Keimzellen) wirken (Wilhelm et al., 2007). Mit der Hormonproduktion durch die Leydig-Zellen (Matsumoto und Bremner, 2011) beginnt die Phase der Geschlechtsdifferenzierung (Eid und Biason-Lauber, 2016). In diesem Abschnitt kontrollieren Sexualhormone der Gonaden die Differenzierung von inneren und äußeren Genitalorganen sowie die Ausbildung eines geschlechtsspezifischen Phänotyps (Eid und Biason-Lauber, 2016). Die Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane erfolgt aus zwei Gangstrukturen, Wolff-Gang und Müller-Gang (Wilhelm und Koopman, 2006). Beide sind zunächst beim männlichen wie weiblichen Embryo zu finden (Wilhelm und Koopman, 2006). Ausgangsstruktur für die Entstehung der männlichen Geschlechtsorgane ist der Wolff-Gang, wohingegen sich der Müller-Gang zurückbildet (Wilhelm und Koopman, 2006). Aus dem Wolff-Gang entstehen unter Androgeneinfluss Nebenhoden, Bläschendrüsen und Samenleiter (Wilhelm und Koopman, 2006). Die Anlagen für die äußeren Genitalorgane werden zunächst als indifferentes Stadium gebildet und bestehen aus einem Genitalhöcker und aus zwei Genitalwülsten (Wilhelm und Koopman, 2006). Die Zellen der sich bildenden äußeren Genitalorgane enthalten den Androgenrezeptor (AR) sowie das Enzym 5 α -Reduktase 2 (Wilhelm und Koopman, 2006). Dieses Enzym bildet aus Testosteron 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) (Wilhelm und Koopman, 2006). DHT steuert über den AR Entwicklung und Morphologie der externen Genitalorgane (Wilhelm und Koopman, 2006).

Die Hoden werden intraabdominell gebildet und dort durch Bandstrukturen (kraniales Ligament, Gubernaculum testis) fixiert, im Verlauf erfolgt die als Hodenabstieg (Descensus testis) bezeichnete, hormonabhängige Verlagerung der Hoden in das Scrotum (Hodensack) (Wilhelm und Koopman, 2006 und Sadler, 2014).

1.3 Das Regulations- und Steuerungshormonsystem von Hypothalamus und Hypophyse
Endokrine Organe werden durch hypophysäre Steuerungshormone reguliert, deren Freisetzung wiederum unter Kontrolle der hypothalamischen Steuerungshormone steht. Im Hypothalamus als übergeordnetem Regulationszentrum werden exogene Informationen mit endogenen Mitteilungen zusammengeführt. Über das parvozelluläre neurosekretorische System steht der Hypothalamus mit der Adenohypophyse in Verbindung. Die hypothalamischen Neurone setzen ihre Steuerungshormone in ein portales Gefäßsystem frei, worüber sie zu den Zellen der Adenohypophyse gelangen. Freisetzungshormone (releasing hormones) aktivieren und freisetzungshemmende Hormone (release-inhibiting hormones) hemmen hierbei die Freisetzung von Hormonen aus der Adenohypophyse. Diese glandotropen Hormone der Adenohypophyse wirken auf endokrine Drüsen sowie teilweise direkt auf Zielorgane. Die Regulation des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems erfolgt über hypothalamisches GnRH (Gonadotropin-Freisetzungshormon) und die beiden Hormone LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (Follikel stimulierendes Hormon) aus der Adenohypophyse. Die GnRH-synthetisierenden Neurone des Hypothalamus besitzen intrinsisch einen charakteristischen Aktivitätsrhythmus, dieser synchronisiert die pulsatile GnRH-Freisetzung. In der Adenohypophyse stimuliert GnRH die Produktion von LH und FSH. Im männlichen Körper wirken LH und FSH auf verschiedene Zelltypen des Hodens: LH steuert die Testosteronbiosynthese der Leydig-Zellen, FSH die Spermatogenese der Sertoli-Zellen. Die Hormonproduktion innerhalb des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems wird durch Rückkopplungsmechanismen reguliert. Zu Beginn der Pubertät wird GnRH produziert und freigesetzt. Das Signal hierfür wird (unter anderem) durch ein Neuropeptid, Kisspeptin (*KISS1/KISS1*), vermittelt. Kisspeptin aktiviert über die Bindung am G-Protein gekoppelten Kisspeptinrezeptor (*KISS1R/KISS1R*) die GnRH-produzierenden Neurone im Hypothalamus und aktiviert somit das Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-System. Die Aktivität dieses Hormonsystems wird auch durch den Zustand des Körpers moduliert. Hierzu kommen Einflussfaktoren wie das

Sättigungshormon Leptin aus weißem Fettgewebe, Katecholamine, endogene Opiode, hypophysäre Steuerungshormone und Sexualsteroiden als endogene Informationen der verschiedenen Körpersysteme mit exogenen Einflüssen im Hypothalamus zusammen. (1.3 nach Köhrle et al., 2014 und Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie)

1.4 Androgene, Testosteronsynthese und -wirkung

Das Steroidhormon Testosteron gehört zu den Androgenen und vermittelt als männliches Sexualhormon die Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane, die Entwicklung des männlichen Phänotyps und die Ausprägung sekundärer Geschlechtsmerkmale (Schweizer et al., 2014). Die Testosteronsynthese im männlichen Körper erfolgt hauptsächlich durch die Leydig-Zellen des Hodens, über LH-Rezeptoren in der Zellmembran wird das Signal zur Testosteronsynthese vermittelt (Schweizer et al., 2014). Cholesterin dient als Ausgangssubstanz für die Steroidhormonproduktion, zunächst entsteht hieraus Pregnenolon (Schweizer et al., 2014). Nachfolgend sind im menschlichen Hoden zwei Synthesewege für Testosteron möglich, die als $\Delta 4$ - und $\Delta 5$ -Weg bezeichnet werden, auch eine Verbindung beider Wege ist möglich (Schweizer et al., 2014). Der beim Menschen favorisierte $\Delta 5$ -Weg verläuft über 17α -Hydroxypregnenolon zu Dehydroepiandrosteron (DHEA), das zu $\Delta 5$ -Androstendiol reduziert wird, woraufhin aus $\Delta 5$ -Androstendiol durch Oxidation Testosteron gebildet wird (Schweizer et al., 2014). Im $\Delta 4$ -Weg wird aus Pregnenolon zunächst Progesteron produziert und dann zu 17α -Hydroxyprogesteron hydroxyliert, hieraus entsteht Androstendion, das zu Testosteron reduziert wird (Schweizer et al., 2014). Ein weiterer Ort der Testosteronsynthese ist die Zona reticularis der Nebennierenrinde, hier wird aus Pregnenolon über 17α -Hydroxypregnenolon Dehydroepiandrosteron (DHEA) synthetisiert, sulfatiert (DHEA-S) und DHEA-S in die Blutzirkulation freigesetzt (Schweizer et al., 2014). Leydig-Zellen können DHEA-S aufnehmen und desulfatieren, sodass aus DHEA mittels Reduktion wieder Testosteron gebildet werden kann (Schweizer et al., 2014). Die Androgenwirkung wird über den Androgenrezeptor (AR) vermittelt, hierzu bildet in peripheren Zielzellen das Enzym 5α -Reduktase 2 aus Testosteron Dihydrotestosteron (DHT), welches an den AR bindet (Schweizer et al., 2014). (bisheriger Textabschnitt 1.4 nach Schweizer et al., 2014, in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie).

DHT ist ein Androgen mit stärkerer Wirkung, da die Affinität von DHT zum AR im Vergleich mit der Affinität von Testosteron zum AR höher ist (Achermann und Hughes, 2011). Noch nicht lange bekannt ist ein alternativer Weg der DHT-Bildung, dieser wird als „backdoor pathway“ bezeichnet (Auchus, 2004). Der „backdoor pathway“ verläuft ausgehend von 17α -Hydroxyprogesteron, welches 5α und 3α reduziert wird (Auchus, 2004). Über mehrere Zwischenschritte wird nachfolgend Androstanediol gebildet, woraus durch anschließende Oxidation DHT entsteht (Auchus, 2004). Dieser alternative Weg der DHT-Bildung könnte bei beeinträchtigter Testosteronsynthese als möglicher Ersatz-Syntheseweg für Androgene eine Kompensationsmöglichkeit darstellen (Auchus, 2004). Der Rezeptor der Androgene, AR, ist ein im Cytosol lokalisierter, nukleärer Rezeptor, der nach Ligandenbindung in den Nukleus transportiert wird (Achermann und Hughes, 2011). Dort reguliert er als Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor die Transkription von Zielgenen (Achermann und Hughes, 2011). Kürzlich wurde die *in vivo* Bedeutung von 11-Hydroxy- und 11-Keto-Androgenen erkannt, die als bioaktive Androgene den AR bei physiologischen Konzentrationen aktivieren können und an physiologischen sowie pathophysiologischen Vorgängen beteiligt sind (O'Reilly et al., 2017 und Rege et al., 2013 und Rege et al., 2018 und Rege et al., 2019 und Turcu et al., 2016).

1.5 SHBG (Sexualhormonbindungsprotein)

In den Leydig-Zellen des Hodens wird Testosteron synthetisiert und in die Blutzirkulation freigesetzt. Testosteron liegt im Blut zu 0,5 - 3 % in freier Form vor. Der überwiegende Teil zirkuliert gebunden an Plasmatransportproteine. 30 - 44 % des Testosterons wird durch SHBG transportiert. SHBG ist ein homodimeres, glycosyliertes Protein, das überwiegend in Hepatocyten gebildet wird. Es besteht aus einer leichten und einer schweren Kette. Diese werden von einem Gen codiert und zeigen eine identische Aminosäuresequenz. Der Unterschied findet sich in ihrer Glycosylierung. Als Funktionen der SHBG-Glycosylierungen werden eine Beeinflussung der Plasmahalbwertszeit sowie Interaktionsfunktionen mit der Zellmembran angenommen. SHBG bindet Testosteron und Dihydrotestosteron, zusätzlich ist eine Bindung von Östradiol mit geringerer Affinität möglich. Einen weiteren Syntheseort für SHBG stellen die Zellen des Hodens dar, diese produzieren eine verkürzte Form von SHBG. Zudem werden 54 - 68 % des Testosterons durch Albumin transportiert. SHBG und Albumin unterscheiden sich in ihren Bindungs-

affinitäten zu Testosteron. SHBG bindet Testosteron hoch affin ($1,6 \times 10^{-9}$ mol/L). Hieraus resultiert eine niedrige Testosterondissoziation von SHBG. Im Gegensatz dazu bindet Albumin Testosteron mit niedrigerer Affinität ($1,0 \times 10^{-4}$ mol/L), sodass dieses leichter aus der Transportproteinbindung dissoziieren kann. (1.5 nach Matsumoto und Bremner, 2011, in: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, Hrsg. Williams Textbook of Endocrinology)

1.6 Androgeninsensivitätssyndrome (AIS)

Androgeninsensivität beschreibt beim männlichen Karyotyp 46,XY eine vollständige oder partielle Resistenz gegenüber den biologischen Androgeneffekten bei differenzierten Hoden und altersentsprechenden Hormonleveln (Hughes et al., 2012).

1.6.1 Komplettes Androgeninsensivitätssyndrom

AR-Mutationen, die einem kompletten Androgeninsensivitätssyndrom (CAIS) zugrunde liegen, führen bei männlichem Karyotyp 46,XY zur Entwicklung eines weiblichen Phänotyps (Achermann und Hughes, 2011). Die externen Genitalorgane sind weiblich entwickelt, eine blind endende Vagina ist vorhanden (Achermann und Hughes, 2011). Meistens sind als innere Genitalorgane die männlichen Organstrukturen angelegt, Bestandteile der weiblichen inneren Genitalorgane können zusätzlich vorliegen (Achermann und Hughes, 2011). Als Gonaden sind Hoden ausgebildet, die abdominell oder entlang des Descensusverlaufs liegen können (Achermann und Hughes, 2011). Im Pubertätsalter fallen Betroffene zumeist durch einen charakteristischen klinischen Phänotyp auf: Normales Wachstum mit regelrechter Brustentwicklung (Thelarche) bei geringer bis keiner Achsel-/ Schambehaarung und Ausbleiben der Menstruation (primäre Amenorrhoe) (Achermann und Hughes, 2011). Auch kann eine CAIS-Diagnosestellung im Kindesalter erfolgen, auffällig sind bei phänotypisch weiblichen Kindern Hernien-ähnliche Vorwölbungen der Leiste oder der Labien, die durch (teil-) deszendierte Hoden entstehen (Hughes et al., 2012). Bei klinischer/phänotypischer CAIS-Präsentation liegen überwiegend *AR*-Mutationen zugrunde (circa 90 %) (Achermann und Hughes, 2011). Auch andere DSD-assoziierte Gene, wie beispielsweise an der Androgensynthese beteiligte Gene, können ursächlich für einen CAIS-ähnlichen Phänotyp sein (Hughes et al., 2012). CAIS-Phänotyp zusammen mit nachgewiesener *AR*-Mutation ergibt die Diagnose CAIS

(Hughes et al., 2012). In dieser Arbeit wird nachfolgend die klinische/phänotypische CAIS-Präsentation ohne (bisherigen) Nachweis einer *AR*-Mutation als CAIS-ähnlich, in Anlehnung an Hughes, et al., 2012, oder als klinische/phänotypische CAIS bezeichnet.

1.6.2 Partielles Androgeninsensitivitätssyndrom

Bei einem partiellen Androgeninsensitivitätssyndrom (PAIS) ist das Ansprechen der Zielzellen auf Androgene vermindert, Betroffene zeigen durch einen unvollständig männlich entwickelten Phänotyp eine Teilresistenz für die hormonelle Stimulation durch männliche Sexualsteroiden (Achermann und Hughes, 2011). Die äußeren Genitalorgane fallen durch intergeschlechtliche Entwicklung mit gleichzeitigem Vorliegen männlicher und weiblicher Charakteristika auf, zusätzlich können isolierte oder kombinierte Auffälligkeiten wie Hypospadie, Micropenis und geteiltes Scrotum (Scrotum bifidum) vorliegen (Achermann und Hughes, 2011). Auch kommen nicht deszendierte Hoden mit abdomineller, inguinaler oder präscrotaler Lage vor (Achermann und Hughes, 2011). Die inneren Geschlechtsorgane sind mit Nebenhoden, Bläschendrüsen und Samenleitern meist normal ausgebildet (Achermann und Hughes, 2011). Eine PAIS resultiert aus *AR*-Mutationen (Hughes et al., 2012). Einem PAIS-ähnlichen Phänotyp liegen vielfältige molekulargenetische Ursachen zugrunde, betroffene Gene stehen im Zusammenhang mit der Geschlechtsdetermination und Geschlechtsdifferenzierung (Eid und Bason-Lauber, 2016) sowie mit Androgenstoffwechsel und -wirkung (Hughes et al., 2012). In dieser Arbeit wird nachfolgend die klinische/phänotypische PAIS-Präsentation ohne Nachweis einer *AR*-Mutation als PAIS-ähnlich, in Anlehnung an Hughes, et al., 2012, oder als klinische/phänotypische PAIS bezeichnet.

1.6.3 Minimales Androgeninsensitivitätssyndrom

Das minimale oder milde Androgeninsensitivitätssyndrom (MAIS) weist ein vielfältiges Spektrum der klinischen Präsentation auf und kann in verschiedenen Altersgruppen unterschiedliche Merkmale zeigen (Achermann und Hughes, 2011). Hierzu gehören Hypospadien im Kindesalter, Gynäkomastie bei Jugendlichen sowie Oligospermie, erhöhte LH-Werte und Infertilität bei Erwachsenen (Achermann und Hughes, 2011). Ursächlich für ein MAIS sind *AR*-Mutationen (Hughes, et al., 2012).

1.6.4 Der Androgenrezeptor

Das Androgenrezeptorgen (*AR*) befindet sich auf dem X-Chromosom (Xq11 - q12) (Achermann und Hughes, 2011), *AR*-Mutationen werden daher bei männlichem Karyotyp als hemizygot (Schaaf und Zschocke, 2013) bezeichnet. Exon 1 des *AR* enthält die N-terminale Transaktivierungsdomäne (NTD), Exon 2 - 3 codiert für die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die über eine hinge-Region mit der Ligandenbindungsdomäne (LBD) (Exon 4 - 8) verbunden ist (Achermann und Hughes, 2011). Der AR gehört zu den nukleären Rezeptoren, die als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren wirken (Achermann und Hughes, 2011). Alle Androgene interagieren mit diesem einen Androgenrezeptor (Achermann und Hughes, 2011). Der AR ist im Cytoplasma der Zellen lokalisiert, als Folge der Ligandenbindung wird der AR aus seinem Komplex mit Chaperonen freigesetzt und in den Nukleus transportiert (Achermann und Hughes, 2011). Dort bindet er als Homodimer an die DNA und aktiviert androgenabhängige Genexpressionsprozesse und somit die Umsetzung von Androgeneffekten in hormonellen Zielstrukturen (Achermann und Hughes, 2011).

1.6.5 Androgenrezeptormutationen

Mehrere Hundert unterschiedliche *AR*-Mutationen sind beschrieben und in einer Datenbank ([http:// www.mcgill.ca/androgendb/](http://www.mcgill.ca/androgendb/), Gottlieb et al., 2012, Tab. 3) zu finden (Audi et al., 2010). Die Auswirkung von *AR*-Mutationen reicht von verminderter bis zu fehlender Reaktion der Zielzellen auf hormonelle Stimulation (Achermann und Hughes, 2011). Je nach Mutation resultieren unterschiedliche Schweregrade der klinisch-phänotypischen Auswirkung bei 46,XY Individuen, sodass *AR*-Mutationen allen Ausprägungsformen der Androgeninsensitivitätssyndrome CAIS, PAIS und MAIS zugrunde liegen können (Achermann und Hughes, 2011). Die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Mutation im Androgenrezeptorgen unterscheidet sich zwischen einem CAIS-(ähnlichen) Phänotyp und einem PAIS-(ähnlichen) Phänotyp (Audi et al., 2010). Sind DSD-Individuen phänotypisch weiblich und fallen durch inguinale Hernien im Kindesalter oder durch ausbleibende Pubertätsentwicklung im Jugendalter auf, liegen diesen CAIS-(ähnlichen) Phänotypen überwiegend *AR*-Mutationen zugrunde (circa 90 %) (Achermann und Hughes, 2011). Bei einem PAIS-(ähnlichen) Phänotyp, der intergeschlechtlich entwickelte Genitalorgane zeigt, beträgt die Wahrscheinlichkeit für eine *AR*-Mutation 24 % (Deeb et

al., 2005). Findet sich eine *AR*-Mutation in mehreren Individuen, kann sich die phänotypische Ausprägung interindividuell unterscheiden, sodass einer bestimmten *AR*-Genmutation nicht allgemeingültig CAIS, PAIS oder MAIS zugeordnet werden kann (Audi et al., 2010). Eine molekulargenetische Untersuchung des *AR* zusammen mit klinisch-phänotypischen Angaben ermöglicht eine Zuordnung zu einem der AIS (Audi et al., 2010 und Hughes et al., 2012).

1.7 Hormontransport

1.7.1 Hormontransporthypothesen

Zur zellulären Aufnahme von Steroidhormonen finden sich zwei Erklärungsrichtungen. Die erste Erklärungsrichtung fokussiert nach Mendel (1989, 1992) und Recant und Riggs (1952) die funktionelle Bedeutung ungebundener Hormone und ist in zwei Hypothesen zu unterteilen: Nach der ersten Hypothese hängt die intrazelluläre Hormonkonzentration und somit die hormonelle Aktivität vom Anteil des freien Hormons im Blutplasma ab („freie Hormonhypothese“, nicht allgemeingültig). Nach der zweiten Hypothese, der „freien Hormontransporthypothese“, sollen nur freie, nicht proteingebundene Hormone durch Zellmembranen diffundieren können, da die Dissoziation von Protein und Hormon als limitierender Faktor der zellulären Hormonaufnahme beschrieben wurde (Mendel, 1989 und Mendel, 1992). Die zweite Erklärungsrichtung nach Hryb et al. (1990) berücksichtigt Hormontransportproteine, an die ein Großteil des jeweiligen Hormons im Blutplasma gebunden ist (Hryb et al., 1990). Für SHBG wird ein in der Zellmembran vorhandener Rezeptor beschrieben, jedoch nicht näher charakterisiert (Hryb et al., 1990). Der Transportmechanismus für Sexualsteroid soll mit der Bindung von SHBG ohne Liganden an einen Membranrezeptor starten (Hryb et al., 1990). Folgt die Bindung eines freien Sexualsteroids an den Komplex aus SHBG und Membranrezeptor, soll eine Signalkaskade folgen oder das Hormon transportiert werden können (Hryb et al., 1990).

1.7.2 Steroidtransport über ein Membrantransportprotein in *Drosophila*

Verschiedenste physiologische Prozesse werden auch bei Insekten hormonell gesteuert (Yamanaka et al., 2013). Das Steroidhormon Ecdyson wird im endokrinen Gewebe der Larven gebildet (Rewitz et al., 2006) und durch eine P450 Monooxygenase zur aktiven

Form 20-Hydroxyecdysone hydroxyliert (Petryk et al., 2003). Ecdysone beeinflusst die Genexpression zur Regulation von Insektenwachstum und -entwicklung (Thummel, 1996 und Yamanaka et al., 2013). Die endokrine Freisetzung von Ecdysone erfolgt durch calciumvermittelte Exocytose aus Speichervesikeln (Yamanaka et al., 2015). *In vitro* Untersuchungen zeigen zudem, dass ein Transportprotein der ATP-binding cassette Familie (ABC-Transporter) einen Ecdysone-Transporter für den aktiven Ecdysone-Transport aus dem Cytosol in die Speichervesikel darstellt (Yamanaka et al., 2015). Dies dient der Akkumulation von Ecdysone in den Speichervesikeln und stellt einen Transport gegen den Konzentrationsgradienten dar (Yamanaka et al., 2015). Ecdysone wirkt über nukleäre Rezeptoren (Yamanaka et al., 2013). Für eine Ecdysone-vermittelte Zellantwort ist das Gen eines Ecdysoneimporters (*Ecl*) erforderlich, *Ecl* codiert für ein Membranprotein der organischen Anionentransporter (OATP) und wird in Ecdysone-responsivem Gewebe exprimiert (Okamoto et al., 2018). Der Phänotyp einer *Ecl*-Defizienz zeigt sich durch einen Entwicklungsstillstand im Larvenstadium und entspricht dem Phänotyp eines Ecdysone-rezeptordefekts (Okamoto et al., 2018). Zudem ist bei *Ecl*-Funktionsverlust keine Aufnahme von Ecdysone aus den Insektenhämolymphe in die betroffenen Zellen nachweisbar (Okamoto et al., 2018). Zellmodelle zeigen, dass für eine effektive Induktion der Genexpression über den Ecdysone-rezeptor ein funktionsfähiger Ecdysone-transporter vorliegen muss (Okamoto et al., 2018). Ein intrazellulär unkontrolliertes Ecdysonelevel, simuliert durch *Ecl*-Überexpression, führt bei *Drosophila*-Larven zu vollständiger embryonaler Letalität (Okamoto et al., 2018). Dies weist auf die Notwendigkeit einer regulierten intrazellulären Ecdysonekonzentration hin, was durch eine gesteuerte zelluläre Aufnahme vermittelt werden kann (Okamoto et al., 2018).

1.7.3 Zelluläre Aufnahme sulfatierter Steroide

Sulfatierte Sexualsteroiden sind als hormonelles Reservoir zur Bildung von Androgenen und Östrogenen beschrieben (Pasqualini und Chetrite, 2005 und Selcer et al., 2002). Die Bildung aktiver Hormone aus sulfatierten Vorstufen erfolgt durch Steroidsulfatasen (Labrie et al., 2001 und Strott, 2002). Eine intrazelluläre Spaltung sulfatierter Steroide im Zielgewebe setzt eine Hormonaufnahme aus der Blutbahn in die Zielzellen voraus (Fietz et al., 2013). Zunächst wurde bei Ratten ein natriumabhängiges Transportprotein, Soat, in hormonaktiven Organen charakterisiert, dessen Substrate sulfatierte Steroide darstellen

(Geyer et al., 2004). Beim Menschen ist das hierzu homologe Transportprotein SOAT (*SLC10A6*) überwiegend im Hoden und auch in Plazentagewebe nachweisbar (Geyer et al., 2007). Eine Analyse der Steroid-Transportaktivität von SOAT-transfizierten HEK293-Zellen zeigt, dass sulfatierte Steroide Substrate des SOAT darstellen (Geyer et al., 2007). Trophoblastenzellen der Plazenta zeigen eine Dehydroepiandrosteronsulfat-Aufnahme, der ein Transportprotein zugrunde liegen muss (Ugele und Simon, 1999). Die Charakteristik dieses Transports ähnelt der SOAT-Aktivität, sodass die Aufnahme von DHEA-S in Trophoblastenzellen SOAT-vermittelt ablaufen könnte (Geyer et al., 2007). Im Hoden wird SOAT während der Spermatogenese in Spermatozyten und Spermatozyden exprimiert (Fietz et al., 2013). Die Transportfunktion des SOAT ermöglicht die zelluläre Aufnahme sulfatierter Steroide ohne strukturelle Modifikation während des Transportprozesses (Fietz et al., 2013). Bei beeinträchtigter Spermatogenese ist die SOAT-Expression reduziert bis nicht zu detektieren (Fietz et al., 2013). Führt dies zu einem verminderten Transport sulfatierter Steroide, wird eine reduzierte lokale Bereitstellung von Steroidhormonen vermutet (Fietz et al., 2013). Die genetische Inaktivierung von *Soat* in Mäusen zeigte jedoch keine Auswirkungen auf Sexualentwicklung/ -funktion, sodass für diese Vorgänge eine essentielle physiologische Bedeutung des Soat-vermittelten Transports sulfatierter Androgene infrage gestellt werden kann (Bakhaus et al., 2018).

1.7.4 Das endocytotische Transportprotein Megalin (LRP2)

Das Gen *LRP2* (low-density lipoproteinreceptor-related protein 2) der *LRP*-Familie codiert für Megalin, ein Typ I Transmembranprotein aus insgesamt 4660 Aminosäuren (Saito et al., 1994). Das Molekulargewicht beträgt circa 500 kDa (Orlando et al., 1992 und Saito et al., 1994). Megalin besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz (25 Aminosäuren), einer 4400 Aminosäuren langen extrazellulären und einer 213 Aminosäuren langen intrazellulären Domäne (Saito et al., 1994). Dazwischen befindet sich der aus 22 Aminosäuren bestehende Transmembranabschnitt (Saito et al., 1994). Der N-terminale extrazelluläre Anteil enthält insgesamt 36 LDLR-Abschnitte (low-density lipoproteinreceptor) zur Ligandenbindung, im C-terminalen intrazellulären Abschnitt liegen zwei NPXY-Motive (Asn-Pro-Xaa-Tyr) (Saito et al., 1994). NPXY-Motive stellen das Signal für eine Clathrin-vermittelte Endocytose dar (Chen et al., 1990 und Paccaud et al., 1993). Megalin/LRP2

stellt ein endocytotisches Transportprotein dar (Chatelet et al., 1986 und Willnow et al., 1999).

1.7.5 Megalinexpression und -funktion

Eine Analyse der Megalinexpression in den Organsystemen der Ratte zeigt, dass Megalin überwiegend im proximalen Tubulus der Niere sowie in Organen des männlichen und weiblichen Reproduktionssystems exprimiert wird (Zheng et al., 1994). Megalin ist zuständig für die Endocytose verschiedenster Liganden (Willnow et al., 1999) und kann hierfür mit weiteren Proteinen der Zelloberfläche (wie Cubilin) interagieren (Birn et al., 2000 und Hammad et al., 2000). Megalindefizienz führt zu einem renalen Verlust der Endocytosesubstrate, die aus Bindungs- und Transportproteinen sowie deren Liganden bestehen (Birn et al., 1997 und Birn et al., 2000 und Christensen et al., 1999 und Leheste et al., 1999). Zu diesen Megalinsubstraten gehören Carrierproteine des Blutplasmas (α 1-Mikroglobulin, β 2-Makroglobulin) (Leheste et al., 1999), Vitamin B12 (Cobalamin) gebunden an Transcobalamin (Birn et al., 1997), Retinol (Vitamin A) am Bindungsprotein Retinol bindendes Protein (RBP) (Christensen et al., 1999), Albumin (Birn et al., 2000), HDL (High-density lipoprotein) /Apolipoprotein A - I (Hammad et al., 2000). Durch Megalin vermittelte endocytotische Prozesse finden sich auch im Hormonsystem, Megalinliganden sind hier beispielsweise Transthyretin (mit Tetrajodthyronin, T4) (Sousa et al., 2000), und das Steroid Vitamin D3 am Vitamin D bindenden Protein (DBP) (Nykjaer et al., 1999).

1.7.6 Autosomal-rezessive *LRP2*-Mutationen verursachen das Donnai-Barrow-Syndrom

LRP2-Mutationen führen autosomal-rezessiv zum Donnai-Barrow-Syndrom (Kantarci et al., 2007), das durch Entwicklungsverzögerung, faciale Dismorphien, congenitale Zwerchfellhernien, Augenanomalien, Hörverlust und Agenesie der Mittellinienstruktur Corpus callosum des Gehirns gekennzeichnet ist (Chassaing et al., 2003 und Donnai und Barrow, 1993). Die Beeinträchtigung endocytotischer Prozesse führt zu einer tubulären Proteinurie, zusätzlich sind RBD und DBP im Urin nachweisbar (Kantarci et al., 2007). Die Mittelliniendefekte stehen im Zusammenhang mit der Beteiligung von Megalin an der Signaltransduktion Sonic Hedgehog-vermittelter Entwicklungsprozesse (Christ et al., 2012 und Christ et al., 2016 und Willnow et al., 2007), auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

1.7.7 Ein *Lrp2*-Knockout Mausmodell zeigt beeinträchtigte Sexualsteroidwirkung

Hammes et al. haben nachgewiesen, dass im Sexualhormonsystem die endocytotische Aufnahme von - an SHBG gebundenem - Testosteron und Östrogen über Megalin erfolgt (Hammes et al., 2005). Mittels eines *Lrp2*-Knockout Mausmodells wurde die pathophysiologische Konsequenz einer defekten *Lrp2*-abhängigen Sexualsteroid-Endocytose dargestellt (Hammes et al., 2005). Weibliche Knockout-Mäuse fallen durch eine verschlossene Vaginalöffnung auf (Hammes et al., 2005). Bei Megalin-Wildtyp-Mäusen bildet sich die Vaginalöffnung im Pubertätsalter östrogenvermittelt aus, trotz vorhandener Östrogene läuft dieser Prozess bei *Lrp2*-Knockout-Mäusen nicht ab (Hammes et al., 2005). Bei männlichen *Lrp2*-Knockout-Mäusen ist der Descensus testis (Hodenabstieg) gestört, was sich als Maldescensus testis (Hodenhochstand) äußert (Hammes et al., 2005). Ursache hierfür ist die bei Megalindefizienz unzureichende Rückbildung des oberen Keimdrüsenbands, das die Hoden in ihrer abdominellen Lage fixiert (Hammes et al., 2005). Als Folge verbleiben die Gonaden intraabdominell (Hammes et al., 2005). Eine exogene Androgenstimulation hat keinen Effekt auf die Rückbildung des kranialen Keimdrüsenbands oder auf die Verlagerung der Hoden in das Scrotum (Hammes et al., 2005). Die nicht-deszendierten Hoden zeigen verringerte Volumina, Defekte der testikulären Zellstrukturen und beeinträchtigte Keimzellbildung, wofür die erhöhte intraabdominelle Temperatur verantwortlich gemacht wurde (Hammes et al., 2005). Die sowohl bei männlichen wie bei weiblichen *Lrp2*-Knockout-Mäusen beeinträchtigten sexualhormonabhängigen Prozesse trotz vorhandener Sexualhormone zeigen, dass ein *Lrp2*-abhängiger endocytotischer Prozess für die Aufnahme von Sexualsteroiden in bestimmten Zielzellen limitierend ist (Hammes et al., 2005). Durch einen Defekt dieses Hormon-Endocytose-Mechanismus bei Megalindefizienz resultiert eine (Teil-) Insensitivität für Androgene und Östrogene an manchen Zielstrukturen der Sexualsteroiden (Hammes et al., 2005).

1.8 Hintergrund und Ausgangsbasis dieser Arbeit

Im Rahmen der biochemischen Diagnostik an eingesandten Genitalhautfibroblasten ist zwischen 1980 und 2006 am Universitätsklinikum Bonn eine anonymisierte endokrinologisch-pädiatrische Biobank entstanden. Diese besteht aus Proben von über 700 Individuen mit DSD-Phänotyp und umfasst eine Altersspanne vom Neugeborenen bis zum Erwachsenen. Enthalten ist für jeden DSD-Fall eine Genitalhautfibroblastenzelllinie, die

durch die ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert biochemisch charakterisiert worden war. Zusätzlich liegen klinisch-phänotypische Beschreibungen und Untersuchungsergebnisse vor, soweit diese mit der jeweiligen eingesendeten Zelllinie bereitgestellt wurden. Die Einsendungen wurden anonymisiert, es sind daher keine datenerhebenden Personen der klinischen Informationen darstellbar. Die Aufgabe des Bonner Labors war die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors sowie die Bestimmung der Aktivität des Enzyms 5 α -Reduktase 2 (ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Für den AR wurden die Parameter Ligandenbindung (B_{max} , Referenzwert: > 18 fmol/mg Protein) und Dissoziationskonstante (K_D , Referenzwert: 0,22 \pm 0,08 nM) (ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Weidemann et al., 1996) sowie Thermostabilität (Referenzwert: > 60 %) (ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990) ermittelt. Dazu wurden Genitalhautfibroblasten mit aufsteigenden Konzentrationen an radioaktivem DHT mit und ohne Überschuss an nicht-radioaktivem DHT inkubiert und nach Zellaufschluss und Zentrifugation die freien Steroide mittels Aktivkohle aus dem Überstand entfernt (Brown und Migeon, 1981 und Schweikert et al., 1989). Durch Radioaktivitätsmessung wurde für die jeweilige DHT-Konzentration die Steroidbindung bestimmt: Anhand der nur mit radioaktivem DHT inkubierten Zellen die gesamte Steroidbindung, anhand der mit radioaktivem DHT plus nicht-radioaktivem DHT inkubierten Zellen die unspezifische Steroidbindung und aus der Differenz dieser Radioaktivitäten die spezifische rezeptorgebundene Steroidfraktion (Brown und Migeon, 1981 und Schweikert et al., 1989). Mittels Scatchard Plots (Scatchard, 1949) wurde die rezeptorgebundene Steroidfraktion in Abhängigkeit von der DHT-Konzentration dargestellt und hieraus Bindungskapazität und Dissoziationskonstante bestimmt (Brown und Migeon, 1981 und Schweikert et al., 1989). Für die Analyse der Thermostabilität des AR-DHT-Komplexes wurde in Genitalhautfibroblasten die Bindung von radioaktivem DHT bei 37 °C und 42 °C ermittelt, Kontrollfibroblasten zeigen hier eine vergleichbare Ligandenbindung (Griffin, 1979 und Schönau et al., 1990 und ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). In den Unterlagen der Fibroblastensammlung wird eine verminderte DHT-Bindung als quantitativer Rezeptorbindungsdefekt und eine abweichende Dissoziationskonstante oder eine reduzierte Thermostabilität als qualitativer Rezeptorbindungsdefekt bezeichnet (Griffin, 1979 und Schönau et al., 1990 und

Schweikert et al., 1993 und ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Für die 5α -Reduktase 2 wurde die Enzymaktivität (Referenzwert: > 1 pmol/mg Protein/h (Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989)) über die Bildung von DHT aus Testosteron untersucht (ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Hierzu wurden aufgeschlossene Genitalhautfibroblasten mit radioaktivem [^3H] Testosteron und dem Standard [^{14}C] DHT inkubiert und die anschließend extrahierten Steroide mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Leshin et al., 1978 und Schweikert et al., 1989 und Wilson, 1975). Das radioaktive [^{14}C] DHT und das durch die 5α -Reduktase 2 aus [^3H] Testosteron gebildete DHT wurden im Szintillationszähler durch den Nachweis von [^{14}C] und [^3H] bestimmt, über den Nachweis der Radioaktivität des bekannten Standards kann aus der Radioaktivität des nachgewiesenen [^3H] DHT die Aktivität der 5α -Reduktase 2 ermittelt werden (Leshin et al., 1978 und Schweikert et al., 1989). Die biochemischen Analysen der in meiner Arbeit betrachteten DSD-Fälle sind teilweise publizierte Ergebnisse, die beim Aufbau der Fibroblastensammlung von der ehemaligen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert erhoben wurden. Die datenerhebenden Personen der klinischen Informationen sind aufgrund der Anonymisierung der Fibroblastensammlung nicht bekannt. Ein weiteres Kriterium stellte der von Hornig et al. (2016) durchgeführte APOD Assay dar, womit die Genexpression des in Genitalhautfibroblasten androgenregulierten Gens *APOD* (Apolipoprotein D), (Appari et al., 2009), ermittelt wurde (Hornig et al., 2016). Hierzu wurde die *APOD*-Induktion an mit 10 nM DHT stimulierten Genitalhautfibroblasten analysiert (Hornig et al., 2016). Durch Cut-off-Werte dieser *APOD*-Induktion von 2,29/2,36, abhängig von der Lokalisation der Genitalhautbiopsie sowie von der Vergleichsgruppe, wurde die Androgenresponsivität der Fibroblastenzelllinien überprüft (Hornig et al., 2016). Werte der *APOD*-Induktion oberhalb des jeweiligen Cut-offs zeigen eine normale Androgenresponsivität an, Werte unterhalb des jeweiligen Cut-offs weisen auf eine funktionelle Androgenresistenz hin (Hornig et al., 2016). Mittels intaktem APOD Assay sollte eine Beeinträchtigung/Mutation des Androgenrezeptors möglichst ausgeschlossen werden. Hinweise auf einen potentiellen Hormontransportdefekt (1.9, 1.10) bei reduzierter *APOD*-Induktion sind fraglich, da anzunehmen ist, dass DHT-Konzentration von 10 nM (Hornig et al., 2016) einen möglichen Hormontransportdefekt (1.9, 1.10) *in vitro* verschleiern/kompensieren könnten. Zudem ist zu vermuten, dass eine mögliche verminderte DHT-Aufnahme (1.9, 1.10) das APOD Assay

aufgrund der Dauer von DHT-Inkubation (Hornig et al., 2016) und *APOD*-Induktion/Genexpression wenig beeinträchtigt. Die dargestellte anonymisierte Genitalhautfibroblastensammlung mit den beschriebenen zugehörigen Unterlagen und Daten wurde mir im Rahmen der Zusammenarbeit von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. U. Schweizer sowie durch eine Kollaboration mit Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus und Dr. rer. nat. N. C. Hornig in Kiel zur Verfügung gestellt. Hieraus entstand die Publikation „**Marko HL**, Hornig NC, Betz RC, Holterhus PM, Altmüller J, Thiele H, Fabiano M, Schweikert HU, Braun D, Schweizer U. Genomic variants reducing expression of two endocytic receptors in 46,XY differences of sex development, Human Mutation, 2022“. Bereits erhobene und mir zur Verfügung gestellte Daten sind gekennzeichnet („1.8“, „1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert“ „1.8, anonymisierte Einsendung“, „Hornig et al., 2016“).

1.9 Erkenntnisse über Schilddrüsenhormone und mögliche Relevanz für Steroide

Klinisch-phänotypisch zeigt ein Großteil der DSD-Fallbeschreibungen eine verminderte Ausprägung androgenvermittelter Charakteristika (1.8, anonymisierte Einsendung). An Geschlechtsdetermination und Geschlechtsdifferenzierung (Eid und Bason-Lauber, 2016) sowie von Androgensynthese zu Androgenwirkung ist eine Vielzahl an Genen beteiligt, die mutationsbedingt einer atypischen Geschlechtsentwicklung, einem beeinträchtigten Sexualsteroidstoffwechsel und einer Beeinflussung der hormonellen Effekte zugrunde liegen könnte (4.12) (Audi et al., 2018 und Baetens et al., 2019 und Buonocore et al., 2019 und Eggers et al., 2016 und Fan et al., 2017 und Hughes et al., 2019 und Xu et al., 2019). Androgene wirken in ihren Zielzellen (Achermann und Hughes, 2011). Hieraus entstand die Frage, ob in der Fibroblastensammlung Fälle zu finden sein könnten, bei denen der Schritt zwischen synthetisiertem Androgen und intrazellulärer Wirkung beeinträchtigt ist. Dieser Überlegung liegt die Frage zugrunde, wie Sexualsteroid in ihre Zielzellen gelangen (Schweizer et al., 2019). Betrachtet man die Entwicklung dieser Fragestellung bei anderen Hormonen, findet sich eine umfassende Charakterisierung von Physiologie (Friesema et al., 2003 und Hennemann et al., 2001 und Visser et al., 2011) und Pathophysiologie (Dumitrescu et al., 2004 und Friesema et al., 2004 und Friesema et al., 2006 und Visser et al., 2011) der Hormontransportproteine für Schilddrüsenhormone (Schweizer et al., 2019). Auf anfängliche Beschreibungen zur Bindungskinetik der Schild-

drüsenhormone an Zellmembranen (Tata, 1975) folgten erste Nachweise eines aktiven Transportprozesses (Christensen et al., 1954 und Krenning et al., 1978 und Rao GS et al., 1976), die im Verlauf durch Analysen der Schilddrüsenhormonaufnahme in verschiedenste Zelltypen bestätigt wurden (Hennemann et al., 2001 und Schweizer et al., 2019). Der Nachweis spezifischer Transportproteine wie MCT8 (Monocarboxylattransporter 8, *SLC16A2*) (Friesema et al., 2003) und dessen Bezug zu einem Krankheitsbild, Allan-Herndon-Dudley-Syndrom (Dumitrescu et al., 2004 und Friesema et al., 2004), zeigt die essentielle Bedeutung der zellulären Hormonaufnahme für hormonell vermittelte Effekte und Prozesse (Schweizer et al., 2019). Aus diesen Erkenntnissen des Schilddrüsenhormon-Transports lässt sich das Modell der passiven Diffusion für Steroidhormone in Frage stellen und die Möglichkeit gezielter Transportmechanismen in Betracht ziehen (Schweizer et al., 2019). Beschreibungen aktiver Transportprozesse im Steroidhormonstoffwechsel liegen für verschiedene Steroidhormone und unterschiedliche Zelltypen vor (Hammes et al., 2005 und Nykjaer, et al. 1999 und Okamoto et al., 2018 und Rao ML et al., 1976 und Rao et al., 1977 und Rao, 1981 und Schweizer et al., 2019). Ergänzend zu in den Kapiteln 1.7 dargestellten Erkenntnissen zu Hormontransportprozessen lässt die Cortisolaufnahme in Leberzellen der Ratte (Rao ML et al., 1976 und Rao et al., 1977) aus Kombination von beobachteter Geschwindigkeit, Temperaturabhängigkeit, sättigbarem Verlauf sowie die Möglichkeit der kompetitiven Hemmung eine Carrier-vermittelte zelluläre Cortisolaufnahme vermuten (Rao ML et al., 1976). Die Geschwindigkeit der intrazellulären Cortisolakkumulation sowie die erreichte Konzentration als Vielfaches des extrazellulären Cortisols weisen auf aktive Vorgänge hin (Rao et al., 1977). Bei den Schilddrüsenhormonen verdeutlicht die Zuordnung von beeinträchtigtem Hormontransport und Krankheitsbild (Dumitrescu et al., 2004 und Friesema et al., 2004) die medizinische Relevanz von Hormontransportprozessen (Schweizer et al., 2019). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, potentielle Hormontransportproteine mit zugehörigen klinischen Beschreibungen, Syndromen oder Krankheitsbildern zusammenzubringen (Schweizer et al., 2019). Aus zugrunde liegenden Transportmechanismen können pathophysiologische Auswirkungen verstanden und Therapieoptionen abgeleitet werden (Schweizer et al., 2019).

1.10 Fragestellung und Zielsetzung

Aus der anonymisierten Fibroblastensammlung habe ich anhand der klinisch-phänotypischen und medizinisch-biochemischen Informationen (1.8) der DSD-Individuen 16 Fälle ausgewählt, für die bisher keine molekulargenetische DSD-Ursache bekannt war. Mein Ziel ist die Analyse dieser DSD-Fälle auf Gene und Mechanismen, die im jeweiligen Einzelfall der DSD-Entstehung zugrunde liegen können. Hierfür überprüfe ich Gene, die als DSD verursachend bekannt sind (4.12), um den jeweiligen Fall mit Beschreibungen aus der Literatur zu vergleichen. Anhand von Literaturdaten zu DSD-Entstehungsmechanismen soll die Auswirkung einer jeweiligen Genmutation auf die DSD-Entwicklung dargestellt werden. Zusätzlich suche ich (neue) Gene, die für potentielle hormontransportierende Membranproteine (Schweizer et al., 2019) codieren. Durch eine Charakterisierung der gefundenen Transmembrantransporter suche ich ein Erklärungsmodell für die gezielte zelluläre Aufnahme von Steroidhormonen beim Menschen (Schweizer et al., 2019). Ein solches Modell ermöglicht mir die Darstellung eines vollständig neuen Konzeptes der DSD-Entstehung beim Menschen: Genmutationen, die einen Hormontransportmechanismus betreffen (Schweizer et al., 2019), könnten die Geschlechtsentwicklung über verminderte intrazelluläre Konzentrationen der Sexualsteroiden in Zielzellen beeinträchtigen und die hierdurch herabgesetzte hormonelle Stimulation der Genexpression (Achermann und Hughes, 2011) begründen.

2. Material und Methoden

2.1 Fibroblastensammlung: Auswahl zu analysierender DSD-Fälle

Ausgangslage war eine anonymisierte Sammlung von Genitalhautfibroblasten von über 700 Individuen mit DSD (1.8). Für jeden Fall lagen klinisch-phänotypische Beschreibungen (1.8, Einsendungen wurden anonymisiert, keine datenerhebenden Personen darstellbar) sowie die biochemische Charakterisierung (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) einer Fibroblastenlinie vor. Retrospektiv wurden aus dem vorhandenen Material Übersichten erstellt. Für 16 Fälle mit männlichem Karyotyp 46,XY sollte durch Exomsequenzierung eine molekulargenetische DSD-Ursache gefunden werden. Ausgeschlossen wurden Individuen mit Aberrationen der Gonosomen. Die Auswahl von 16 Fällen erfolgte nach Analyse der jeweils vorliegenden klinisch-phänotypischen und biochemischen Daten des Gesamtkollektivs (1.8). Phänotypische Auswahlkriterien waren PAIS-ähnliche Charakteristika, die aus klinischen Beschreibungen (1.8, anonymisiert, keine datenerhebenden Personen darstellbar) entnommen wurden. Biochemische Auswahlkriterien waren Auffälligkeiten des AR (Ligandenbindung/-dissoziation, Thermostabilität, 1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) aufgrund meiner Vermutung, dass eine Beeinträchtigung der intrazellulären Hormon-Rezeptor-Bindung auf Mutationen in Genen, die an einem potentiellen Hormontransport (Schweizer et al., 2019) beteiligt sind, hinweisen könnte. Zusätzlich sollte eine normale Enzymaktivität der 5 α -Reduktase 2 (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) vorliegen. Ergänzt wurden wenige Fälle mit Abweichungen von diesen biochemischen Kriterien. Als weiteres Auswahlkriterium wurden Ergebnisse des APOD Assay (Hornig et al., 2016) verwendet, hier sollten die Zelllinien eine DHT-vermittelte APOD-Induktion oberhalb des Cut-offs von 2,29/2,36 (abhängig von der Lokalisation der Genitalhautbiopsie) anzeigen und somit auf eine intakte AR-vermittelte Genexpression in Gegenwart hoher DHT-Spiegel hinweisen (Hornig et al., 2016). Zudem wurde ein Fall mit PAIS-ähnlichem Phänotyp und leicht reduzierter APOD-Induktion ergänzt (Hornig et al., 2016). Zusätzlich wurden zum Vergleich zwei Fälle mit klinischer Diagnose „CAIS“ ausgewählt, da diese eine vollständige phänotypische Resistenz gegenüber Androgeneffekten zeigen. Für beide lagen die Ergebnisse des APOD Assay unterhalb des Cut-offs (Hornig et al., 2016). Durch die von den biochemischen/APOD Assay Kriterien (teil-) abweichenden

Fälle sollte das Spektrum möglicher zugrunde liegender Genmutationen erweitert werden. Für den Einzelfall sollte anhand der jeweiligen Genmutation ein Erklärungsmodell der DSD-Entstehung gebildet werden. Zudem enthält die Genitalhautfibroblastensammlung (1.8) Zelllinien von Individuen ohne DSD, die als Kontrollen eingesetzt werden. Diese Arbeit beinhaltet eine Kollaboration und Publikation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus in Kiel (1.8), für die Verwendung der beschriebenen Fibroblastensammlung liegt daher die Zustimmung der zuständigen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität Kiel vor (Kiel, Deutschland, AZ: D415/11) (1.8).

2.2 Substanzen und Materialien, Kits, Geräte, Programme

Chemikalien, allgemeine Laborsubstanzen/-materialien und Gebrauchsgegenstände stammen von Applichem (Darmstadt), Carl ROTH (Karlsruhe), Sarstedt (Würzburg), Thermo Fisher Scientific (USA), Sigma-Aldrich (USA), A. Hartenstein (Nürmbrecht), Roche (Schweiz), Bio-Rad (USA), Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf), VWR Life Science (USA), Cytiva (USA). Zellkulturmaterialien/-substanzen wurden von Sarstedt (Würzburg) und Thermo Fisher Scientific (USA) verwendet. Eingesetzte Substanzen, Reagenzsysteme und Kits sind in Tabelle 1 aufgeführt. In Tabelle 2 finden sich die verwendeten Geräte und Utensilien. Datenbanken und Software sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 1: Verwendete Substanzen, Reagenzsysteme, Kits

Reagenzsystem/Kit	Hersteller	Artikelnummer
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, USA	170-8891BUN
KAPA-HiFi PCR Kit KAPABIOSYSTEMS	Roche, Schweiz	07958846001
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren	740410.100
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, USA	A1360
Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	A44390
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, USA	32106
QIAquick® Gel Extraction Kit (250)	Qiagen, Hilden	28706
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit und E. coli (Escherichia coli) XL-10 Gold Ultracompetent Cells	Agilent Technologies, USA	2105119-5 200314
Takyon Low ROW SYBR 2x Mastermix blue dTTP	Eurogentec, Belgien	UR-LSMT-B0705

Tab. 2: Verwendete Geräte und Utensilien

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Classic Gel Dokumentation	Intas, Göttingen
Entwicklungsmaschine CAWOMAT 2000 IR	CAWO, Schrobenhausen
Gelelektrophoresesystem	peqlab, Erlangen
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Mastercycler epgradient S realplex ²	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler nexus GSX1	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Telaval 32	Zeiss, Oberkochen
NanoDrop™ 2000	Thermo Fisher Scientific, USA
Netzgerät Power Supply E865, E802	Consort, Belgien
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer GENESYS™	Thermo Fisher Scientific, USA
Pipette Eppendorf research (0,1 - 2,5 µL, 0,5 - 10 µL, 10 - 100 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator 3016	GFL, Burgwedel
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tuberotator	VWR, USA
Ultraschallstab Sonifier 250	Branson, USA
UV-Transilluminator	Pharmacia LKB Biotechnology AB, Schweden
Waage BP 2100S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge 5430R und 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 3: Verwendete Datenbanken und Software

Datenbank / Software	Quelle
Adobe Illustrator CS6	Adobe Inc., USA
Adobe Photoshop CS6	Adobe Inc., USA
ApE A plasmid Editor	https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/ (Davis, MW)
BLAST	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
gnomAD	https://gnomad.broadinstitute.org
GraphPad Prism 6	Graphpad Software, Inc., USA
fathmm v.2.3	Shihab et al., 2013; http://fathmm.biocompute.org.uk
ImageJ64	https://imagej.net/ImageJ
MutationAssessor release 3	Reva et al., 2007; http://mutationassessor.org/r3/
MutationTaster2	Schwarz et al., 2014; http://www.mutationtaster.org
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
Office 2016, 2019	Microsoft, USA
PolyPhen-2	Adzhubei et al., 2010; http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
RRID	https://scicrunch.org/resources

RVIS v4	Petrovski et al., 2013; http://genic-intolerance.org
SIFT 4G	Vaser et al., 2016; https://sift.bii.a-star.edu.sg
The Androgen Receptor Gene Mutations Database	http://androgendb.mcgill.ca von Gottlieb B. et al., Gottlieb et al., 2012, letzter Aufruf: 21.06.2018
ThermoFisher Tm Calculator	https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html
varbank	Cologne Center of Genomics: https://varbank.ccg.uni-koeln.de
Vectorator Pro	Linearity, Vladimir Danila: https://www.vectorator.io/company

2.3 Zelllinien

2.3.1 Genitalhautfibroblasten

Die Genitalhautfibroblasten wurden Jahre bis Jahrzehnte vor Beginn dieser Arbeit von Individuen mit DSD entnommen (1.8, anonymisierte Einsendung) und biochemisch charakterisiert (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Seither lagerten die Zelllinien in flüssigem Stickstoff. Weitere Arbeitsgruppen, wie Prof. Dr. med. P.-M. Holterhus und Dr. rer. nat. N. C. Hornig in Kiel arbeiten mit den beschriebenen Fibroblasten (1.8, Hornig et al., 2006). Im Rahmen meiner Arbeit habe ich die Genitalhautfibroblasten auf DNA-, RNA- und Proteinebene untersucht.

2.3.2 HAP1-Zellen

HAP1-Zellen sind humane haploide Zellen, pro Gen ist nur ein Allel vorhanden (horizonTM, UK). Durch Knockout dieses einen Allels bleibt der Zelle keine Kompensationsmöglichkeit durch ein zweites Allel. Hierdurch ist nach Transfektion von HAP1-Knockout Zellen mit DNA des Knockout-Gens die Analyse der Proteinexpression ohne Einfluss endogener Wildtypproteine möglich. HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen (horizonTM, UK, Katalognummer HZGHC007405c011) wurden zur transienten Transfektion der Plasmid-DNA von *LMBR1L*-Wildtyp und *LMBR1L*-Mutanten genutzt. Diese Knockout-Zellen zeigen eine Rasterschubmutation innerhalb der codierenden Sequenz von *LMBR1L* (S2, Marko et al., 2022), die eine endogene *LMBR1L*-Bildung stören soll (horizonTM, UK). HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen wurden zum Ausschluss von Einflüssen des endogenen *LMBR1L* zur transienten Transfektion verwendet, um jeweils die Proteinexpression von *LMBR1L*-Wildtyp und *LMBR1L*-Mutanten darzustellen.

2.3.3 HEK293 (Human Embryonic Kidney, menschliche embryonale Nierenzellen) -Zellen
HEK293-Zellen (aus Laborbestand) sind humane Zellen, die durch Transformation einer menschlichen embryonalen Zelle mit DNA des menschlichen Adenovirus 5 hergestellt wurden (Graham et al., 1977). HEK293-Zellen wurden zur transienten Transfektion der Plasmid-DNA von *LMBR1L*-Wildtyp und *LMBR1L*-Mutanten genutzt, um die jeweilige Proteinexpression darzustellen.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Zellkulturmedien

Zur Herstellung der Zellkulturmedien wurden Medien und Substanzen von gibco®, Thermo Fisher Scientific, USA sowie DMSO (A3672,0100) von Applichem, Darmstadt verwendet.

Tab. 4: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Art des Mediums	Zusammensetzung
Fibroblastenkulturmedium	MEM + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep (5000 U/mL) + 1 % GlutaMAX 100x + 1 % Natriumpyruvat (100 mM), + 1 % MEM-Vitamin Solution 100x + 0,2 % Uridin (\geq 99 %, U3003-5G, Sigma-Aldrich, USA)
Fibroblasten-konservierungsmedium	Fibroblastenkulturmedium + 10 % DMSO
HEK293-Zellkulturmedium	DMEM/F-12 (1:1) + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep
HEK293-Zellkonservierungsmedium	HEK293-Zellkulturmedium + 10 % DMSO
HAP1- Zellkulturmedium	IMDM + 10 % FBS + 1 % Pen/Strep
HAP1-Zellkonservierungsmedien	Medium A: IMDM + 20 % FBS Medium B: IMDM + 20 % FBS + 20 % DMSO
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O; pH 7,4
1x PBS	100 mL 10x PBS, 900 mL dH ₂ O

2.4.2 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der verwendeten drei Zellarten Genitalhautfibroblasten (2.3.1), HAP1-Zellen (2.3.2) und HEK293-Zellen (2.3.3) erfolgte in einem Inkubator (Binder, Tuttlingen) bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 %. Sämtliche

Arbeiten an lebenden Zellen fanden unter einer Zellkulturbank (Herasafe™, Thermo Fisher Scientific, USA) statt. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist in Tabelle 4 dargestellt. Genitalhautfibroblasten, HEK293-Zellen und HAP1-Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen (aus Polystyrol, Sarstedt, TC-Schale 60: 83.3901/100: 83.3902, TC-Flasche T75: 83.3911) kultiviert. Fibroblasten und HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 95 - 100 % und HAP1-Zellen bei 80 % Konfluenz passagiert oder geerntet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und nach Zugabe von Trypsin für wenige Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Hinzufügen des jeweiligen Zellkulturmediums wurde das Trypsin inaktiviert und ein Teil der Zellen auf neue Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen aufgeteilt.

2.4.3 Auftauen und Wegfrieren von Zellen

Kurz vor Beginn und während meiner Arbeiten wurden die Zellen aus flüssigem Stickstoff (2.3.1) in einen -150 °C Kühlschrank umgebettet. Aliquots der Fibroblasten, HEK293-Zellen und HAP1-Zellen wurden bei -150 °C im jeweiligen Konservierungsmedium (Tab. 4) aufbewahrt. Hierzu wurde der Inhalt einer konfluenten T75 Flasche mit Trypsin gelöst (2.4.2) und zentrifugiert (1200 x g, 5 min). Das entstandene Zellpellet wurde in 500 µL Konservierungsmedium (Tab. 4) resuspendiert und auf Kryoröhrchen (1,2 mL, VWR, 479-1261) verteilt. Bei HAP1-Zellen wurde ein Zellpellet in 500 µL Konservierungsmedium A resuspendiert und zusätzlich 500 µL Konservierungsmedium B in das Kryoröhrchen gegeben. Zum Reaktivieren wurde ein Kryoröhrchen im 37 °C Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension in 5 mL des jeweiligen Kulturmediums (Tab. 4) zentrifugiert (1200 x g, 5 min). Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt, das Zellpellet im Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche mit Kulturmedium (Tab. 4) überführt.

2.4.4 Behandlung von Zellen mit Dihydrotestosteron

Durch Inkubation lebender Fibroblasten (1.8) in Zellmedium ohne Hormone und in Medium mit bekannter DHT-Konzentration sollte ein möglicher Einfluss von Sexualsteroiden auf *LMBR1L*-mRNA-Level überprüft werden. Zunächst wurde hormonfreies Zellkulturmedium hergestellt und anschließend der Hälfte des hormonfreien Zellkulturmediums DHT zugesetzt. Zu 45 mL FBS wurde 1 g Aktivkohle (Charcoal, dextran coated, C6241, Sigma-Aldrich, USA) gegeben, um die Hormone des FBS zu binden. Nach

Inkubation über Nacht unter Rotation bei 4 °C wurde die Aktivkohle samt gebundener Hormone durch Zentrifugation (2000 x g, 15 min) und sterile Filtration (Filtropur, 0,45 µm Porengröße, Sarstedt, Nümbrecht) entfernt. Als hormonfreies Inkubationsmedium wurde Fibroblastenmedium (Tab. 4) mit Aktivkohle-behandeltem FBS hergestellt. Für das DHT-haltige Inkubationsmedium wurde hormonfreies Inkubationsmedium mit 10 nM DHT (5 α -Dihydrotestosteron, D073, Sigma-Aldrich, USA) versetzt. Die Kultivierung der Genitalhautfibroblastenlinien mit DHT-haltigem bzw. hormonfreiem Fibroblastenmedium erfolgte bei einer Konfluenz von 70 - 80 % über sechs Tage mit einem Mediumwechsel alle 48 Stunden. Inkubiert wurden sechs Kontrollzelllinien, drei Zelllinien mit *HSD17B3* (17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 3) -Mutation und sechs Zelllinien mit *AR*-Mutationen. Zellernte, RNA-Isolation, cDNA-Synthese (Bio-Rad Kit, Tab. 1) und qRT-PCR (quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion) -Analyse der *LMBR1L*-mRNA-Level erfolgten wie unter 2.4.5, 2.5.3.2, 2.6.1, 2.6.2 und 2.10 beschrieben.

2.4.5 Zellernte

Die Zellernte erfolgte auf Eis. Nach Waschen mit 5 mL kaltem 1x PBS (Tab. 4) wurden die Zellen in 0,5 - 1 mL kaltem 1x PBS abgekratzt und dies in ein 2 mL Gefäß überführt. Die Schale wurde mit kaltem 1x PBS abgespült und dem 2 mL Gefäß hinzugefügt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 x g, 4 °C, 10 min wurde der Überstand entfernt. Bis zur weiteren Verwendung (Isolation von genomischer DNA, RNA und Proteinen) wurden die Zellpellets bei -20 °C aufbewahrt.

2.4.6 Transiente Transfektion von HEK293- und HAP1-Zellen

Zur transienten Transfektion von HEK293- und HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen mit der Plasmid-DNA von *LMBR1L*-Wildtyp, *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val und pcDNA3 Leervektor wurde PANfect® Transfektionsreagenz und Transfektionspuffer (P02-8010K, PAN-Biotech, Aidenbach) verwendet. HEK293- und HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen wurden in einer T75 Flasche bis zum Erreichen von 95 % Konfluenz im jeweiligen Zellkulturmedium (Tab. 4) kultiviert. Die Zellen wurden trypsiniert (2.4.2) und 1:1 (HEK293-Zellen) /1:3 (HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen) auf eine 6 cm Schale in 5 mL Zellkulturmedium (Tab. 4) gegeben. Drei Mikrogramm Plasmid-DNA wurden mit Transfektionspuffer auf 125 µL aufgefüllt. Pro Probe wurden 110 µL

Transfektionspuffer mit 15 µL Transfektionsreagenz gemischt. 125 µL dieser Mischung wurden dem Transfektionspuffer-DNA-Gemisch hinzugefügt, für 20 Minuten inkubiert und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Im Zellinkubator wurden die HEK293- und HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen über 48 Stunden transfiziert. Zellernte und Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot erfolgten wie in 2.4.5 und 2.9.3 - 2.9.6 beschrieben. Verwendet wurde ein Primärantikörper gegen das HA-Tag (Tab. 28).

2.5 Exomsequenzierung

2.5.1 Isolierung genomischer DNA (gDNA)

Aus Fibroblastenzellpellets wurde gDNA isoliert. Pro Zellpellet einer 10 cm Zellkulturschale wurden 0,6 mL Lysepuffer (Tab. 5) versetzt mit 10 % RNase A (A2760,0500, Applichem, Darmstadt) und 10 % Proteinase K (A7932,0500, Applichem, Darmstadt) verwendet. Lysiert wurde das Zellpellet über Nacht bei 55 °C. Hinzugegeben wurde 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (P3803, Sigma-Aldrich, USA), durch Schütteln gemischt und zentrifugiert (14.000 rpm, RT, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Gefäß überführt und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat sowie 0,7 Volumen Isopropanol hinzugefügt. Bis zum Sichtbarwerden von DNA-Flocken wurde die Probe geschwenkt, dann zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 15 min). Das entstandene DNA-Pellet wurde durch Zentrifugation (14.000 rpm, RT, 5 min) zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen. Bei RT wurde das DNA-Pellet luftgetrocknet und in TE-Puffer (Tab. 5) gelöst. Mittels NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 2) erfolgte die Konzentrationsbestimmung der gelösten DNA. Genomische DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

2.5.2 Analyse der Exomsequenzierung

Zur Exomsequenzierung wurde genomische DNA verwendet, die aus der jeweiligen Genitalhautfibroblastenzelllinie der zu untersuchenden DSD-Individuen (1.8, 2.1) isoliert wurde (Isolation genomischer DNA, siehe Abschnitt 2.5.1). Die Sequenzierung wurde durch das Cologne Center of Genomics (CCG, Köln) durchgeführt, verwendet wurde das Agilent sureselect v6_r2 enrichment kit. Für die Analyse der zurückerhaltenen Daten wurde das Programm varbank (CCG, <https://varbank.ccg.uni-koeln.de>, Tab. 3) der Version varpipe_v2.26 mit dem humanen Referenzgenom 19 eingesetzt. Als Programm-

voreinstellung wurden nur Mutationen mit einer Frequenz von $\leq 0,1$ % ausgewählt. In der Inhouse-Datenbank des varbank-Programms (Tab. 3) sollten die Mutationen zudem nicht vorkommen. Die Exomdaten der 16 DSD-Individuen (1.8, 2.1) wurden auf Mutationen in bekannten DSD-assoziierten Genen (4.12, Liste DSD-assoziiierter Gene) überprüft. Eine Untergruppierung entstand aus Fällen, in denen durch Betrachtung sämtlicher Mutationen in der codierenden Gensequenz kein bekanntes DSD-assoziiertes Gen (4.12) gefunden wurde. Diese wurden auf Mutationen in Genen für mögliche Membrantransportproteine überprüft, die einem Steroidtransportmechanismus (Schweizer et al., 2019) zugrunde liegen könnten. Einordnung, Charakterisierung und Darstellung der Genmutationen erfolgten unter Verwendung von Datenbanken und Software aus Tabelle 3.

2.5.2.1 Mutationsanalyse: Allelfrequenzen und Pathogenität

Die nachgewiesenen Mutationen wurden mit varbank (Cologne Center of Genomics: <https://varbank.ccg.uni-koeln.de>) und gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), (Tab. 3), auf ihre Allelfrequenzen überprüft. Zudem wurden die Genmutationen mit PolyPhen-2 (Adzhubei et al., 2010; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT 4G (Vaser et al., 2016; <https://sift.bii.a-star.edu.sg>), RVIS v4 (Petrovski et al., 2013; <http://genic-intolerance.org>), MutationTaster2 (Schwarz et al., 2014; <http://www.mutationtaster.org>), fathmm v.2.3 (Shihab et al., 2013; <http://fathmm.biocompute.org.uk>) und Mutation-Assessor release 3 (Reva et al., 2007; <http://mutationassessor.org/r3/>) analysiert (Tab. 3). Mittels dieser Mutationsanalysetools kann versucht werden, die mögliche Auswirkung eines Aminosäureaustauschs auf die Proteinstruktur und/oder -funktion vorherzusagen (Adzhubei et al., 2010 und Reva et al., 2007 und Schwarz et al., 2014 und Shihab et al., 2013 und Vaser et al., 2016). RVIS zeigt an, ob ein Gen verglichen mit dem Genom/mit der durchschnittlichen neutralen genetischen Varianz mehr (positive Werte) oder weniger (negative Werte) funktionelle Varianten hat (Petrovski et al., 2013; <http://genic-intolerance.org>). Zudem zeigt der RVIS-Prozentsatz an, zu welchem Prozent der variantenreichen/variantenarmen Gene das betrachtete Gen gehört (Petrovski et al., 2013; <http://genic-intolerance.org>). Die Einordnungen der Mutationen durch Mutationsanalysetools (Tab. 3) soll zusammen mit dem jeweils zugrunde liegenden Aminosäureaustausch diskutiert (mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) werden. Dies soll mit den Erkenntnissen über die

von Mutationen betroffenen Gene und deren möglicher Beteiligung an der DSD-Ausprägung des jeweils betroffenen Individuums (1.8) zusammengeführt werden.

2.5.3 Mutationsnachweis in gDNA und mRNA/cDNA mittels Sangersequenzierung

Aus den Genitalhautfibroblasten von DSD-Individuen/Kontrollen ohne DSD-Phänotyp (1.8, 2.1) wurde gDNA isoliert/RNA isoliert und cDNA synthetisiert und der Mutationsbereich amplifiziert. Ein Nachweis der Genmutationen erfolgte durch Sangersequenzierung.

Tab. 5: Puffer und Lösungen zur gDNA Isolierung und gDNA/cDNA Sequenzierung

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
DNA-Lysepuffer	100 mM Tris – HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2 % SDS, 200 mM NaCl in dH ₂ O
50x TAE	2 M Tris, 0,05 M EDTA, 5,17 % Essigsäure (≥ 99 %); pH 8,1 - 8,3
1x TAE	200 mL 50x TAE ad 10 L dH ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 in dH ₂ O

2.5.3.1 Amplifikation genomischer DNA, DNA-Gelextraktion

Der Bereich der Genmutation wurde mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primerpaare mit Sequenz (Fw, Rv), Annealingtemperatur (°C) und Fragmentlänge (in bp) des Amplikons sind in Tabelle 6 angegeben. Die Erstellung der Primersequenzen erfolgte mittels jeweiliger Genreferenzsequenzen von NCBI (Tab. 3). Zur Berechnung der Annealingtemperatur wurde der ThermoFisher Tm Calculator (Tab. 3) verwendet. Primer wurden von Eurogentec (Belgien) produziert. Für die PCR wurde das KAPA-HiFi PCR Kit (Roche, Schweiz, Tab. 1) sowie PCR-Ansatz und Temperaturprogramm aus Tabelle 7 verwendet.

Tab. 6: Sequenzierungsprimer genomische DNA

Primer	Sequenz	°C	bp
AR p.Arg616His Fw	5' GCCATACTCTGTCCACTTTTTTCATGTGGTAGG 3'	59	517
AR p.Arg616His Rv	5' CCTCACTCACCTTCTGTTGGCTCC 3'		
AR p.Arg856Cys Fw	5' GTCTAATGCTCCTTCGTGGGCATGCTTCC 3'	59	519
AR p.Arg856Cys Rv	5' CTCAAAGAAGAGGGGAAAACATCCAGGTCTG 3'		
MAMLD1 Fw	5' CCCTGTGTCTAGGTCGTTTGGGAAACG 3'	60	340
MAMLD1 Rv	5' CCCACAAGGGGTGGGATCAGCTC 3'		
MAPK-E1 Fw	5' CAGCTGCGCAAAGTGCGGAGTG 3'	63	317
MAPK-E1 Rv	5' CATTCAATTGCCCTCTGCCCGCTC 3'		
MAPK-E4 Fw	5' GAGCCCCTTACCAGATGGCTTC 3'	56	641

MAPK-E4 Rv	5' GTTGAAACACCCGGAGCATCAC 3'		
HSD17B3 Fw	5' CACAGAGAGCCACGGCCAGGG 3'	63	200
HSD17B3 Rv	5' CTGCCCACTGTCCCATTGACCGC 3'		
ZFPM2 Fw	5' GAACCTGAGAGCGGAGTCTGAG 3'	52	858
ZFPM2 Rv	5' CCACCTAAGCTGTTATGATGCATC 3'		
WVOX Fw	5' CGGACTTCAGTCGCCTCTCTCCAAC 3'	61	342
WVOX Rv	5' GTTATTACTGAGACCAGACTCATGCCCGC 3'		
gKISS1 Fw	5' CTCATCTTTCTGTGCCCTCTGTC 3'	59	228
gKISS1 Rv	5' GAAGGAGTTCCAGTTGTAGTTCGG 3'		
<i>LMBR1L</i>			
gp.Arg288Gln Trp Fw	5' GGCTGCCTTTAGACATGGAGCTGCTAC 3'	60	496
gp.Arg288Gln Trp Rv	5' CAGGGCAAACCTGCACAACCTCCTCACTG 3'		
gp.Ile39Val Fw	5' CTTTGCCCATTTACCAACCAGAG 3'	53	760
gp.Ile39Val Rv	5' GAGAGGAGATGACACAGAGCCTG 3'		
<i>LRP2</i>			
p.Ser1707Phe Fw	5' CCTGTACTGGGGCCTCTGGAAGGACAC 3'	60	334
p.Ser1707Phe Rv	5' GGACACAGCACATGTTTCAGTCGCAATTGG 3'		
p.Thr2086Ser Fw	5' ATGCCGCCGAATCCTCAAATGGCTGTAG 3'	60	466
p.Thr2086Ser Rv	5' GAAAAATCTGGGGACGAGGTCTGGAGC 3'		
p.Ile3389Val Fw	5' GCTCTCTTTCTTTTCTGAATGCAG 3'	51	625
p.Ile3389Val Rv	5' GTTGCACACTGAGCTGACTACC 3'		
p.Glu3763Val Fw	5' GAGAGATCAGATCACCTTTGGAC 3'	52	791
p.Glu3763Val Rv	5' CCTAAGACCCAACACCAAATCAG 3'		

Tab. 7: PCR-Programm zur Amplifikation genomischer DNA

PCR-Ansatz genomische DNA	PCR-Temperaturprogramm
50 - 100 ng gDNA, ad 10 µL dH ₂ O Je 0,75 µL Fw Rv Primer (10 µM) 0,75 µL dNTPs (10 mM, KAPA-HiFi Kit) 5 µL 5x Puffer (KAPA-HiFi Kit) 0,5 µL KAPA-HiFi Polymerase Ad 25 µL dH ₂ O	95 °C - 3 min
	98 °C - 20 sec
	Annealingtemperatur – 15 sec x 35
	72 °C - 40 sec
	72 °C - 1 min

Die amplifizierte DNA wurde mit 6x TriTrack DNA Loading Dye (R1161, Thermo Fisher Scientific, USA) versetzt und mittels Gelelektrophorese (Gelelektrophoresesystem peq-lab, Erlangen) in einem 2 %igen TAE-Agarose-Gel (TAE: Tab. 5) aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte für 1 h 15 min bei 110 V. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden aus dem Gel herausgeschnitten. Mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Tab. 1) wurde die DNA nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert und das Produkt sequenziert (2.5.3.3).

2.5.3.2 Isolation von RNA

Die RNA-Isolation aus Zellpellets erfolgte mit TRIzol Reagenz (15596018, Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers. Das entstandene RNA-Pellet wurde in RNase-freiem dH₂O (Water for molecular biology, A7398,1000, Applichem, Darmstadt) resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 2) bestimmt.

2.5.3.2.1 cDNA-Synthese: cDNA für Sequenzierungen

Aus RNA der Genitalhautfibroblasten (2.5.3.2) wurde cDNA synthetisiert, um durch Sequenzierung das Vorliegen von Mutationen in der cDNA darzustellen. Hierfür wurde eine reverse Transkriptase mit Korrekturlese-Aktivität (SuperScript III Reverse Transkriptase, 18080-085, Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet. Ansatz und Temperaturprogramm der cDNA-Synthese sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tab. 8: cDNA-Synthese für Sequenzierungen

Ansatz	Temperaturprogramm
1 µg RNA, ad 11 µL dH ₂ O Zugabe von 1 µL Oligo(dT) 18 Primer (SO132), 1 µL dNTP (100 mM) (dNTP-Set, R0182) je Thermo Fisher Scientific, USA, Dann: Temperaturprogramm 1.	1. 65 °C - 5 min Auf Eis - 1 min
Im Anschluss Zugabe von 4 µL 5x Puffer 1 µL DTT (0,1 M) 2 µL Superscript (SuperScript III Reverse Transkriptase, 18080-085, Thermo Fisher Scientific, USA), Dann: Temperaturprogramm 2.	2. 50 °C - 60 min 70 °C - 15 min
Zuletzt Zugabe von 1 µL RNase H (EN0202, Thermo Fisher Scientific, USA) Dann: Temperaturprogramm 3.	3. 37 °C - 20 min

2.5.3.2.2 cDNA-Amplifikation, Gelelektrophorese und Gelextraktion

Der Bereich der Genmutation wurde mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primerpaare mit Sequenz (Fw, Rv), Annealingtemperatur (°C) und Fragmentlänge (in bp) des Amplikons sind in Tabelle 9 angegeben. Für die PCR wurde das KAPA-HiFi PCR Kit (Roche, Schweiz, Tab. 1) sowie PCR-Ansatz und Temperaturprogramm aus Tabelle 10 verwendet. DNA-Gelelektrophorese und Gelextraktion erfolgten wie in 2.5.3.1 beschrieben.

Tab. 9: cDNA Sequenzierungsprimer

Name	Primersequenz	°C	bp
cKISS1 Fw cKISS1 Rv	5' GGCAGCTACTGCTTTTCCTC 3' 5' TAGTTCGGCAGGTCCTTCTC 3'	57	276
<i>LMBR1L</i>			
cp.Arg288Gln Trp Fw cp.R288Gln Trp Rv	5' ATGGAGCTGCTACACAGACAGG 3' 5' GCTGAACAGAGGCAATGATGGG 3'	55	217
cp.Ile39Val Fw cp.Ile39Val Rv	5' TATCCGTGCGAGAACAGCTA 3' 5' TTGTTGACGGTGGCATCTTC 3'	51	120

Tab. 10: PCR zur Amplifikation von cDNA

PCR-Ansatz cDNA	PCR-Temperaturprogramm
2 µL unverdünnte cDNA je 1 µL Fw Rv Primer (10 µM) 1 µL dNTPs (10 mM, KAPA-HiFi Kit) 10 µL 5x Puffer (KAPA-HiFi Kit) 1,5 µL MgCl ₂ (50 mM, KAPA-HiFi Kit) 0,5 µL Kapa-HiFi Polymerase (KAPA-HiFi Kit) Ad 50 µL dH ₂ O	95 °C - 3 min 98 °C - 20 sec Annealingtemperatur - 15 sec x 35 72 °C - 40 sec 72 °C - 1 min

2.5.3.3 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sangersequenzierungen erfolgten durch Eurofins Genomics (Luxemburg). Sequenzen und Chromatogramme wurden mittels ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/> (Davis, MW), Tab. 3) dargestellt. Mit BLAST® (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Tab. 3.) wurden die sequenzierten Genabschnitte von Wildtyp (Kontrollfibroblasten, 1.8, 2.1) und DSD-Individuen (1.8, 2.1) verglichen. Die Wildtypsequenz wurde den jeweiligen Genmutationen anhand der Chromatogramme gegenübergestellt.

2.6 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Aus Fibroblastenzellpellets wurde wie in 2.5.3.2 beschrieben RNA isoliert und diese zur cDNA-Synthese (2.6.1) verwendet.

2.6.1 cDNA-Synthese: cDNA zur Analyse mittels qRT-PCR

Verwendet wurde das iScript™ cDNA Synthese Kit (Bio-Rad, USA, Tab. 1) nach Angaben des Herstellers. Ansatz und Temperaturprogramm sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Ansatz und Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese für qRT-PCR

Ansatz	Temperaturprogramm
1 µg RNA, ad 10 µL RNase freies dH ₂ O 4 µL 5x cDNA Synthese-Puffer (Bio-Rad Kit) 1 µL reverse Transkriptase (Bio-Rad Kit) ad 10 µL RNase freies dH ₂ O	25 °C - 5 min 46 °C - 20 min 95 °C - 1 min

2.6.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt, Ansatz und Temperaturprogramm sind in Tabelle 12 dargestellt. Die verwendeten Primerpaare mit Sequenz (Fw, Rv) und Annealingtemperatur (°C) sind in Tabelle 13 angegeben. Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen *18S rRNA* (ribosomale RNA) verwendet. Am Ende der qRT-PCR wurde mittels Schmelzkurvenanalyse die Entstehung eines spezifischen qRT-PCR-Produkts überprüft.

Tab. 12: qRT-PCR: Ansatz und Temperaturprogramm

qRT-PCR Ansatz (20 µL Reaktionsvolumen)		Temperaturprogramm
2,5 µL cDNA (1:5 verdünnt)		95 °C - 17 min
<i>LMBR1L</i>	<i>18S rRNA</i>	
Je 0,4 µL Primer Fw und Rv (10 nM)	Je 0,2 µL Primer Fw und Rv (10 nM)	95 °C - 70 sec 60 °C - 45 sec 72 °C - 30 sec x 40
10 µL 2x Takyon SYBR (Eurogentec, Belgien, Tab. 1)	10 µL 2x Takyon SYBR (Eurogentec, Belgien, Tab. 1)	72 °C - 3 min 95 °C - 15 sec 60 °C - 15 sec
Ad µL 6,7 dH ₂ O	Ad µL 7,1 dH ₂ O	60 → 95 °C über 20 min 95 °C - 15 sec Auf 20 °C → Ende

Tab. 13: qRT-PCR Primer

Name	Sequenz	°C
LMBR1L_RT Fw LMBR1L_RT Rv	5' TTTAGACATGGAGCTGCTACACAG 3' 5' GAGACCTGGCCTAAGGAGGTA 3'	60
18S rRNA Fw 18S rRNA Rv	5' TTGACGGAAGGGCACCACCAG 3' 5' GCACCACCACCCACGGAATCG 3'	

2.7 Klonierung des Lipocalinrezeptors 1

Zur Klonierung verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 14 (2.7.1) dargestellt.

2.7.1 Verwendete Puffer

Tab. 14: Klonierung *LMBR1L*: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ampicillin 100 mg/mL	1 g (w/v) Ampicillin (Ampicillin Sodium Salt, A0839,0025, Applichem, Darmstadt) in 10 mL dH ₂ O
LB (lysogeny broth) -Agar	32 g LB-Agar (22700-049, Invitrogen, USA) in 1 L dH ₂ O
LB-Medium	25 g LB-Broth (L-3152, Sigma-Aldrich, USA) in 1 L dH ₂ O
P1	50 mM Tris-Cl, 10 mM EDTA; pH 8,0 in dH ₂ O
P2	200 mM NaOH, 1 % SDS in dH ₂ O
P3	3 M Kaliumacetat pH 5,5 in dH ₂ O
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O; pH 7,4
1x PBS	100 mL 10x PBS, 900 ml dH ₂ O
50x TAE	2 M Tris, 0,05 M EDTA, 5,17 % Essigsäure (≥ 99 %); pH 8,1 - 8,3
1x TAE	200 mL 50x TAE ad 10 L dH ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 in dH ₂ O

2.7.2 Klonierung UTR (untranslatierte Region) -*LMBR1L*-pGEM[®]-T Easy

Die Klonierung des *LMBR1L* erfolgte aus HAP1-Zellen (2.3.2). Wie in Abschnitt 2.5.3.2 beschrieben, wurde aus HAP1-Zellen (Human HAP1 Parental Cell Line, horizon[™], UK, Katalognummer C631) RNA isoliert und 1 µg RNA zur cDNA-Synthese (2.5.3.2.1) verwendet. Mittels Klonierungs-PCR wurde die *LMBR1L*-cDNA amplifiziert. Verwendete Primer binden im UTR der mRNA und sind in Tabelle 15, Klonierungsansatz und Temperaturprogramm in Tabelle 16 dargestellt. Verwendet wurde das KAPA-HiFi PCR Kit (Roche, Schweiz, Tab. 1). Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer stammen von Thermo Fisher Scientific (USA).

2.7.2.1 PCR, A-Tailing und Ligation

Tab. 15: Klonierungsprimer *LMBR1L*

Name	Sequenz	°C
LMBR1L-5' UTR Fw	5' GAGTTTCTGTCGCAGGCTGCGAGGAAAG 3'	63
LMBR1L-3' UTR Rv	5' CAGATTCCAGGTCCTGAGGTCCAAGTAGCCTTG 3'	

Tab. 16: Klonierungsreaktion *LMBR1L* aus HAP1-Zellen

Klonierungsreaktion	Temperaturprogramm
5 µL unverdünnte cDNA	95 °C - 3 min
10 µL 5x Puffer (KAPA-HiFi Kit)	98 °C - 20 sec
Je 1,5 µL Primer Fw Rv (10 µM)	63 °C - 15 sec 35 x
1,5 µL dNTP (10 mM, KAPA-HiFi Kit)	72 °C - 45 sec
1 µL KAPA-HiFi Polymerase	72 °C - 2 min
Ad 50 µL dH ₂ O	

Das entstandene Produkt der Klonierungs-PCR wurde über ein 1x TAE-Agarosegel (TAE: Tab. 14) aufgereinigt. Mittels QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Tab. 1) wurde das DNA-Fragment (1500 bp) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel extrahiert. An das 3'-Ende der elutionsgereinigten *LMBR1L*-Amplifikate wurden dATPs (Desoxyadenosintriphosphat, Tab. 17) angefügt (A-Tailing). Anschließend erfolgte die Ligation von *LMBR1L* mit dem Vektorsystem pGEM®-T Easy. A-Tailing-Ansatz und Ligationsansatz sind in Tabelle 17 dargestellt. Verwendet wurde das pGEM®-T Easy Vector System I Kit (Promega, USA, Tab. 1).

Tab. 17: Ansatz A-Tailing *LMBR1L* und Ligation *LMBR1L* mit pGEM®-T Easy

Ansatz A-Tailing	Ansatz Ligation
23,5 µL der Gelelution	1 µL pGEM®-Teasy (Promega Kit)
0,5 µL Taq-Polymerase (GeneCraft, Köln)	3 µL A-Tailing-Produkt
3 µL 10x Puffer (15 mM MgCl ₂ , GeneCraft, Köln)	5 µL 2x Puffer (Promega Kit)
3 µL 2 mM dATP (R0142, Thermo Fisher Scientific, USA)	1 µL T4-Ligase (Promega Kit)
→ 72 °C für 30 min	→ 4 °C über Nacht

2.7.2.2 Hitzeschock-Transformation kompetenter *E. coli* XL1- Blue

45 µL kompetente *E. coli* (*Escherichia coli*) des Stammes XL1-Blue (aus dem Laborbestand) wurden mit 3 µL des Ligationsansatzes (Tab. 17) transformiert. Hierzu wurde das Gemisch aus Bakterien und Ligationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 sec auf 42 °C erhitzt. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 500 µL LB (lysogeny broth) -Medium (Tab. 14) hinzugegeben und der Ansatz bei 37 °C und 350 rpm für 1 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB (lysogeny broth) -Ampicillin-Platten (100 µg/mL Ampicillin), (Tab. 14) verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Bakterieninkubator, Heraeus, Hanau). Am folgenden Tag wurden Einzelzellklone in je 5 mL LB-Medium (Tab. 14) mit 100 µg/mL Ampicillin gegeben und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm (Innova® 40 Shaker, Eppendorf, Hamburg) kultiviert.

2.7.2.3 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Präp)

Nach Zentrifugation der Bakterienkulturen (4000 rpm, 5 min) wurde das Bakterienpellet in 400 µL P1 (Tab. 14) resuspendiert und in ein 2 mL Gefäß gegeben. 400 µL P2 (Tab. 14) wurden hinzugefügt, durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 400 µL P3 (Tab. 14) wurde die Probe mehrmals invertiert, dann zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 10 min). Zum Überstand wurden 840 µL Isopropanol gegeben und zentrifugiert (14.000 rpm, 4 °C, 10 min). Das Plasmid-DNA-Pellet wurde durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, 5 min) in 500 µL Ethanol (70 %) gewaschen und nach dem Trocknen in 50 µL TE-Puffer (Tab. 14) resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte mittels NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 2).

2.7.2.4 Restriktionsverdau, Gelelektrophorese und Sequenzierung

Durch Kontrollverdau (Tab. 18) und Gelelektrophorese (2.7.2.1) wurden positive *UTR-LMBR1L*-pGEM®-T Easy Klone nachgewiesen. Erwartet wurden zwei Fragmente: *UTR-LMBR1L* (1500 bp) und pGEM®-T Easy (3000 bp). Zur Sequenzkontrolle des klonierten *LMBR1L* wurde die präparierte Plasmid-DNA mit den Primern Sp6 und T7 (Tab. 19) sequenziert (2.5.3.3, Eurofins Genomics, Luxemburg).

Tab. 18: Ansatz Kontrollverdau *LMBR1L* in pGEM[®]-T Easy

Ansatz Kontrollverdau
1 µL DNA 1 µL EcoRI-Puffer (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,5 µL EcoRI (Thermo Fisher Scientific, USA) Ad 10 µL dH ₂ O → 1 h bei 37 °C

Tab. 19: Sequenzierungsprimer Klonierung *LMBR1L*

Name	Sequenz
Sp6	5' ATTTAGGTGACACTATAGAA 3'
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
Bgh Rv	5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
<i>LMBR1L</i> 700 bp Fw	5' CATGTTCTCCGTCCTACTGGGAAG 3'
<i>LMBR1L</i> 800 bp Rv	5' CATGTCTAAAGGCAGCCAGCAGGAAGTAG 3'

2.7.3 Klonierung *HA-LMBR1L*-pGEM[®]-T Easy und *LMBR1L-HA*-pGEM[®]-T Easy

Zum Nachweis der *LMBR1L*-Proteinexpression wurde ein HA (humanes Influenza Hämagglutinin) -Tag verwendet. Kloniert wurde *LMBR1L* mit C-terminalem und *LMBR1L* mit N-terminalem *HA*-Tag. Hierdurch sollten mögliche Auswirkungen der Lage des *HA*-Tags auf die Proteinexpression gezeigt werden können. Die Klonierungsprimer sind in Tabelle 20, Ansatz und Temperaturprogramm der *HA*-Tag-Klonierungs-PCR in Tabelle 21 dargestellt. Verwendet wurde das KAPA-HiFi PCR Kit (Roche, Schweiz, Tab. 1). Gelelektrophorese, Gelextraktion, A-Tailing und Ligation in pGEM[®]-T Easy sowie Hitze-schock-Transformation von *E. coli* XL1-Blue, Bakterienkultivierung und Plasmid-DNA Mini-Präparation sind in 2.7.2, 2.7.2.1 - 2.7.2.4 beschrieben. Der Kontrollverdau von präparierter Plasmid-DNA ist Tabelle 22 zu entnehmen. Die Kontrollsequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte mit den Primern Sp6 und T7 (Tab. 19) durch Eurofins Genomics, Luxemburg (2.5.3.3).

Tab. 20: Primer zum Anfügen des HA-Tags C-terminal und N-terminal an *LMBR1L*

Name	Sequenz	°C
LMBR1L-HA-Tag-N-terminal Fw	5' AGATCTAAGCTTGCCACCATGTACCCTTA TGATGTCCCAGACTATGCAATGGAAGCACC TGACTACGAAGTGCTATCCGTG 3'	62
LMBR1L-HA-Tag-N-terminal Rv	5' AGATCTTCTAGATCACTGGTGCTGGG TCTTCCTAGATGCCTG 3'	62
LMBR1L-HA-Tag-C-terminal Fw	5' AGATCTAAGCTTGCCACCATGGAAGCACC TGACTACGAAGTGCTATCCGTG 3'	62
LMBR1L-HA-Tag-C-terminal Rv	5' TCTAGAAGATCTTCATGCATAGTCTGGG ACATCATAAGGGTACTGGTGCTGGGTCTTCC TAGATGCCTG 3'	62

Tab. 21: Klonierungsansatz und Temperaturprogramm: HA-Tag in pGEM[®]-T Easy

Klonierungsansatz	Temperaturprogramm
0,8 ng UTR- <i>LMBR1L</i> -pGEM [®] -T Easy 10 µL 5x Puffer (KAPA-HiFi Kit) Je 1,5 µL Primer Fw und Rv (10 µM) 1,5 µL dNTP (10 mM, KAPA-HiFi Kit) 1 µL KAPA-HiFi Polymerase (KAPA-HiFi Kit) Ad 50 µL dH ₂ O	95 °C - 3 min
	98 °C - 20 sec
	62 °C - 15 sec x 35
	72 °C - 45 sec
	72 °C - 2 min

Tab. 22: Ansatz Kontrollverdau *LMBR1L* HA-Tag in pGEM[®]-T Easy

Ansatz Kontrollverdau HA-Tag N-terminal	Ansatz Kontrollverdau HA-Tag C-terminal
1 µL DNA 1 µL Tango-Puffer (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,5 µL HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,25 µL XbaI (Thermo Fisher Scientific, USA) Ad 10 µL dH ₂ O → 1h bei 37 °C	1 µL DNA 1 µL Puffer R (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,5 µL HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,25 µL BglII (Thermo Fisher Scientific, USA) Ad 10 µL dH ₂ O → 1 h bei 37 °C

2.7.4 Klonierung HA-*LMBR1L*-pcDNA3 und *LMBR1L*-HA-pcDNA3

Aus pGEM[®]-T Easy wurde *LMBR1L* mit HA-Tag N-terminal/C-terminal in den Vektor pcDNA3 (V79020, Thermo Fisher Scientific, USA) kloniert. Nach präparativem Verdau von *LMBR1L*-pGEM[®]-T Easy (Tab. 23) und Aufreinigung der Fragmente aus einem 1x TAE-Agarosegel (QIAquick[®] Gel Extraction Kit, Tab. 1), siehe 2.7.2.1, wurde HA-*LMBR1L*

in pcDNA3 ligiert (Tab. 24). Hitzeschock-Transformation von *E. coli* XL1-Blue, Bakterienkultivierung und Plasmid-DNA Präparation sind in 2.7.2.2 - 2.7.2.3 beschrieben. Der Kontrollverdau von präparierter Plasmid-DNA ist Tabelle 24 zu entnehmen. Die Plasmid-DNA positiver Klone wurde mit den Primern Bgh Rv, T7, LMBR1L 700 bp Fw, LMBR1L 800 bp Rv (Tab. 19) sequenziert (2.5.3.3, Eurofins Genomics, Luxemburg, 2.7.2.4).

Tab. 23: Ansatz präparativer Verdau *HA-LMBR1L-/LMBR1L-HA-pGEM[®]-T Easy*

Ansatz präparativer Verdau
1 µg Plasmid-DNA: <i>HA-LMBR1L-pGEM[®]-T Easy</i> <i>LMBR1L-HA-pGEM[®]-T Easy</i> 5 µL Puffer R (Thermo Fisher Scientific, USA) 1 µL HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA) 2 µL BglIII (Thermo Fisher Scientific, USA) ad 50 µL dH ₂ O → 2 h bei 37 °C

Tab. 24: Ansatz Ligation *HA-LMBR1L/LMBR1L-HA* mit pcDNA3 und Kontrollverdau

Ansatz Ligation	Ansatz Kontrollverdau
12 µL Elution 1,5 kb Bande (<i>LMBR1L</i> mit <i>HA</i> -Tag) 5 µL Elution 5 kb Bande (pcDNA3) 2 µL 10x T4 Ligasepuffer (B69, Thermo Fisher Scientific, USA) 1 µL T4 Ligase (EL0011, Thermo Fisher Scientific, USA) → 4 °C über Nacht	1 µL DNA 1 µL Puffer R (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,5 µL BglIII (Thermo Fisher Scientific, USA) 0,25 µL HindIII (Thermo Fisher Scientific, USA) ad 10 µL dH ₂ O → 1 h bei 37 °C

2.7.4.1 Retransformation und Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Midi-Präp)

Die Retransformation von *E. coli* XL1-Blue erfolgte mit 3 µL Plasmid-DNA (*HA-LMBR1L-pcDNA3/LMBR1L-HA-pcDNA3*). Das Vorgehen entspricht der in 2.7.2.2 beschriebenen Hitzeschock-Transformation. Retransformierte Bakterien wurden in 50 mL LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL), (Tab. 14), über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert (Innova[®] 40 Shaker, Eppendorf, Hamburg). Nach Zentrifugation (5000 x g, 4 °C, 15 min) wurde die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet präpariert, verwendet wurde das NucleoBond[®] Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Düren, Tab. 1) nach Herstellerprotokoll. Mittels Nano-

Drop™ (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 2) wurde die Konzentration der Plasmid-DNA bestimmt.

2.8 Mutagenese des Lipocalinrezeptors 1

Plasmid-DNA des *LMBR1L*-Wildtyps (C-terminales *HA*-Tag in pcDNA3) wurde für eine Mutagenese-PCR verwendet. Hierdurch werden Punktmutationen in die codierende *LMBR1L*-Sequenz eingefügt. Primer der Mutagenese-PCR sind in Tabelle 25 und Ansatz sowie Temperaturprogramm sind in Tabelle 26 dargestellt. Eingesetzt wurde das QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, USA, Tab. 1).

Tab. 25: Mutageneseprimer *LMBR1L*

Mutation	Primersequenz	°C
Mutp.Arg288Gln Fw Mutp.Arg288Gln Rv	5' GCTGGAGAAGAGGCAGAAGGCTTCAGCCT 3' 5' AGGCTGAAGCCTTCTGCCTCTTCTCCAGC 3'	60
Mutp.Arg288Trp Fw Mutp.Arg288Trp Rv	5' TGCTGGAGAAGAGGTGGAAGGCTTCAGCC 3' 5' GGCTGAAGCCTTCCACCTCTTCTCCAGCA 3'	60
Mutp.Ile39Val Fw Mutp.Ile39Val Rv	5' ACATCCTCTGCCACGTCTTCTGACCCGC 3' 5' GCGGGTCAGGAAGACGTGGCAGAGGATGT 3'	60

Tab. 26: QuikChange Lightning Klonierung der *LMBR1L*-Mutanten in pCDNA3

Ansatz Mutagenese-PCR	PCR-Programm
Pro Mutationsprimerpaar 50 ng DNA: <i>LMBR1L</i> -pcDNA3 HA-Tag C-terminal Je 1,3 µL Primer Fw und Rv (10 µM) aus QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit: -5 µL 10 x Puffer -1 µL QuikSolution -1 µL QuikChange Lightning Enzym -1 µL dNTP-Mix Ad 50 µL dH ₂ O	95 °C - 2 min
	95 °C - 20 sec
	60 °C - 10 sec 18x
	68 °C - 4 min
	68 °C - 5 min
	+ 2 µL DpnI → 37 °C für 5 min (QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit)

2.8.1 Hitzeschock-Transformation in *E. coli* XL10-Gold

Die Aufnahme der jeweiligen Ligationsansätze durch Bakterien erfolgte mittels Hitzeschock-Transformation von ultrakompetenten *E. coli* des Stammes XL10-Gold (Agilent Technologies, USA, Tab. 1). Zu 45 µL XL10-Gold wurden 2 µL Beta-Mercaptoethanol (Agilent Technologies, USA) hinzugegeben. Nach 2 min auf Eis wurden je 2 µL des

Ligationsansatzes hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sec bei 42 °C und weiteren 2 min auf Eis wurden 500 µL (auf 37 °C aufgewärmtes) LB-Medium (Tab. 14) dazugegeben und für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Wachstum von Bakterienkolonien, Einzelzellkultivierung, Mini-Präparation der Plasmid-DNA mit Kontrollverdau (Tab. 24) erfolgte wie in 2.7.2.2 - 2.7.2.4 beschrieben. Retransformation in *E. coli* XL1-Blue und Midi-Plasmid-DNA-Präparation erfolgten wie in 2.7.4.1, der Kontrollverdau ist in Tabelle 24 dargestellt, die Gelelektrophorese erfolgte wie in 2.7.2.1. Die Sequenzierung der jeweiligen Plasmid-DNA ist in 2.5.3.3 und 2.7.2.4 zu finden.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

Für die proteinbiochemischen Methoden verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 27 (2.9.1) dargestellt, eingesetzte Antikörper finden sich in Tabellen 28 und 29 (2.9.2).

2.9.1 Proteinbiochemische Methoden: Verwendete Puffer und Lösungen

Tab. 27: Proteinbiochemische Methoden: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10 % APS	1 g Ammoniumpersulfat pro 10 mL dH ₂ O
Blockierungslösung	5 % Magermilchpulver, 0,3 % Tween20 in 1x PBS
20 % Gellösung	162,3 mL 40 % Acrylamidlösung, 65 mL 2 % Bisacrylamidlösung (3037.1 und 3039.1, Carl Roth, Karlsruhe)
Homogenisationspuffer	250 mM Saccharose, 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 1 mM EDTA, 1mM DTT; pH 7,4 in dH ₂ O
Laemmli-Probenpuffer (4x)	200 mM Tris – HCl (pH 6,8), 20 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol, 16 % SDS
10x PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 17,8 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, 2,5 g KH ₂ PO ₄ in 1 L dH ₂ O; pH 7,4
1x PBS	100 mL 10x PBS, 900 mL dH ₂ O
Ponceau-Rot	0,1 % Ponceau S in 5 %iger Essigsäure
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS; pH 6,8 in dH ₂ O
10x SDS-Laufpuffer	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1 % SDS in dH ₂ O
10x SDS-Transferpuffer	116,28 g Glycin, 58,54 g Tris, 33 mL SDS (20 %) ad 2 L dH ₂ O
1x SDS-Transferpuffer	100 mL 10x Transferpuffer, 100 mL Methanol ad 1800 mL dH ₂ O
10x TBS	100 mM Tris, 1,5 M NaCl in dH ₂ O; pH 7,4
1x TBS	100 mL 10x TBS, 900 mL dH ₂ O

10x Transferpuffer	1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, in dH ₂ O
1x Transferpuffer	20 mL 10x Transferpuffer, 20 mL Methanol ad 160 mL dH ₂ O
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl, 0,4 % SDS; pH 8,8 in dH ₂ O
Waschpuffer	0,03 % Tween20 in 1x PBS

2.9.2 Verwendete Antikörper

Tab. 28: Verwendete Primärantikörper mit RRID (<https://scicrunch.org/resources>)

Antikörper	Verdünnung	RRID	Firma	Artikelnummer
anti-β-Actin (m)	1:25.000	AB_262011	Sigma-Aldrich, USA	A3854
anti-HA-Tag (rb)	1:1000	AB_307019	abcam, UK	ab9110
anti-LMBR1L (rb)	1:1000	AB_2136130	proteintech, USA	12154-1-AP
anti-LRP2 (rb)	1:1000	AB_10673466	abcam, UK	ab76969
anti-Vinculin (rb)	1:1000	AB_477629	Sigma-Aldrich, USA	V9131

Tab. 29: Verwendete Sekundärantikörper mit RRID (<https://scicrunch.org/resources>)

Antikörper	Verdünnung	RRID	Firma	Artikelnummer
HRP goat anti-m	1:15.000	AB_10015289	Jackson Immunosciences, UK	115-035-003
HRP goat anti-rb	1:15.000	AB_2313567	Jackson Immunosciences, UK	111-035-003

2.9.3 Isolation von Protein

Die Lyse des Zellpellets erfolgte größenabhängig in 50 - 350 µL Homogenisationspuffer (Tab. 27) versetzt mit 1 mM DTT und 1x Protease-Inhibitor (cOmplete Tablets EASYpack Protease Inhibitor Cocktail Tablets, 04693116001, Roche, Schweiz). Durch Ultraschall (40 % Duty Cycle) wurde die DNA der Zellen zerstört. Mittels Zentrifugation (14.000 rpm, 4 °C, 20 min) wurde die Membranproteinfraktion (Pellet) von der cytoplasmatischen Proteinfraktion (Überstand) getrennt. Das Membranproteinpellet wurde größenabhängig in 50 - 200 µL Homogenisationspuffer/DTT/Protease-Inhibitor resuspendiert.

2.9.4 Proteinbestimmung

Nach erneuter Ultraschallbehandlung (40 % Duty Cycle) erfolgte die photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Hierbei bindet der Coomassie-Farbstoff Brilliant-Blau G-270 bei saurem pH-Wert an Proteine,

wodurch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm photometrisch messbar ist (Bradford, 1976). Diese Änderung der Absorption wird zur Bestimmung des Proteingehalts einer Probe genutzt (Bradford, 1976). Das Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006, Bio-Rad, USA) wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet. Durch eine Eichreihe aus BSA-Standards (0 - 25 µg/µL BSA) kann die jeweilige Proteinkonzentration anhand der Standardgeraden angegeben werden (Bradford, 1976).

2.9.5 SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Natriumdodecylsulfatbindung maskiert die Eigenladungen von Proteinen und ersetzt diese durch eine einheitliche negative Ladung, mittels denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Verwendete Puffer und Lösungen sind in Tabelle 27 (2.9.1), die Zusammensetzung eines Polyacrylamid-Gels ist in Tabelle 30 dargestellt. Die eingesetzten Proteinmengen sind in Tabelle 31 angegeben. Proteinproben wurden mit dH₂O auf ein gemeinsames Volumen aufgefüllt, mit 4x Laemmli-Probenpuffer (Tab. 27) versetzt und bei 95 °C für 10 min inkubiert. Der Gellauf erfolgte in einem SDS-Page-Gellaufsystem (peqlab, Erlangen) bei einer Spannung von 60 V im Sammelgel und 110 V (LMBR1L) / 140 V (LRP2) im Trenngel. Für LMBR1L wurde der Gellauf nach Herauslaufen der 15 kDa Proteinmarkerbande (PageRuler Prestained Protein Ladder, 26617, Thermo Fisher Scientific, USA) gestoppt. Für LRP2 wurde der Gellauf gestoppt, sobald sich die 117 kDa Markerbande (HiMark™ Pre-Stained Protein Standard, LC5699, Thermo Fisher Scientific, USA) im unteren Bereich des Gels befand.

Tab. 30: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels

Substanz	Trenngel 10 %	Sammelgel
dH ₂ O	5 mL	6 mL
Trenngelpuffer	5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	3 mL
20 % Acrylamid-Gellösung	10 mL	3 mL
THEMED	20 µL	12 µL
10 % APS	200 µL	120 µL

Tab. 31: Verwendete Proteinmengen für SDS-Page

Zellart	Proteinmenge
Fibroblasten	30 - 40 µg (LRP2) 10 - 20 µg (LMBR1L) Membranprotein 90 µL Eluat Oberflächenbiotinylierung
HEK293-Zellen	10 µg Membranprotein als Positivkontrolle 2,5 µg Membranprotein
HAP1-Zellen	10 - 20 µg Membranprotein, 75 µL Eluat Oberflächenbiotinylierung

2.9.6 Proteintransfer

2.9.6.1 Semi-Dry-Blot und Immundetektion

Mittels Semi-Dry-Blot-Verfahren (Semi-Dry-Blot-System, peqlab, Erlangen) wurden in 1x Transferpuffer (Tab. 27) die im Gel enthaltenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,45 µm Porengröße (Amersham™ Protran™, Cytiva, USA) übertragen. Der Proteintransfer fand bei 25 V und 300 mA für 50 min statt. Zur Transferkontrolle wurde die Membran für 60 sec in Ponceau-Rot (Tab. 27) gefärbt. Bis zur Darstellung einzelner Banden wurde die Membran in dH₂O gewaschen und danach in Blockierungslösung (Tab. 27), (1 h, RT) inkubiert. Die Inkubation der Membran mit in Blockierungslösung verdünntem Primärantikörper (Tab. 28) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Für je zehn Minuten wurde die Membran dreimal in Waschpuffer (Tab. 27) gewaschen. Nach der Inkubation (60 min, RT) im Sekundärantikörper (Tab. 29) verdünnt in Blockierungslösung wurden die Waschschrte wiederholt. Mittels ECL-Lösung (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 1) wurde das zu detektierende Protein auf einem Chemilumineszenz-Film (Medical X-ray Filme Super RX-N, FUJIFILM, Japan) sichtbar gemacht.

2.9.6.2 Proteintransfer durch Nass-Blot

Für den Proteintransfer der LRP2-SDS-Page wurde aufgrund des hohen LRP2 Molekulargewichts (Saito et al., 1994 und Orlando et al., 1992) ein Nass-Blot-Verfahren (Nass-Blot-System, Bio-Rad, USA) gewählt. Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran mit 0,45 µm Porengröße (Amersham™ Protran™, Cytiva, USA) fand bei 25 V, 100 mA und 150 W über Nacht bei 4 °C in 1x SDS-Transferpuffer (Tab. 27) statt. Die weiteren Schritte erfolgten wie in 2.9.6.1 beschrieben.

2.9.7 Oberflächenbiotinylierung

Mittels Oberflächenbiotinylierung sollte die Expression von LMBR1L-Wildtyp und LMBR1L-Mutanten an der Zelloberfläche dargestellt werden, dies wurde an Genitalhautfibroblasten sowie an HAP1-Zellen durchgeführt. Für die HAP1-Zellen wurde mit der Oberflächenbiotinylierung 48 Stunden nach transienter Transfektion (2.4.6) der jeweiligen Plasmid-DNA in HAP1-LMBR1L-Knockout-Zellen begonnen. Verwendet wurde das Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, USA, Tab. 1) nach (modifizierten) Angaben des Herstellers. Die transfizierten Zellen/die Genitalhautfibroblasten wurden für 30 min auf Eis in einer biotinylierenden Lösung (Sulfo-NHS-SS-Biotin, Bindung an Lysinreste zur Biotinylierung von Proteinen, Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit) inkubiert. Nach Zugabe der Stopplösung (Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit) wurden die Zellen abgekratzt und in ein 50 mL Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zentrifugation (1000 x g, 4 °C, 5 min) wurden die Zellen zweimal mit 1x TBS (Tab. 27) gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in 125 µL Lysepuffer (Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit) versetzt mit 1x Proteaseinhibitor (cOmplete Tablets EASYpack Protease Inhibitor Cocktail Tablets, 04693116001, Roche, Schweiz) resuspendiert. Vom nun vorliegenden Gesamtprotein wurden 15 µL für einen Western Blot (2.9.5 - 2.9.6) zur Überprüfung der transienten Transfektion verwendet. Mittels NeutrAvidin Säule wurden die biotinylierten Oberflächenproteine aus dem Gesamtproteinlysate aufgereinigt. Nach Zugabe von jeweils 500 µL Waschpuffer (Pierce™ Cell Surface Biotinylation and Isolation Kit) wurde die Säule durch Zentrifugation (1 min, 1000 x g) viermal gewaschen. Durch Inkubation in 250 µL 1x Elutionspuffer (50 mM Tris mit pH 7,5, 10 % Glycerin, 50 mM DTT) wurden die biotinylierten Proteine von der NeutrAvidin Säule gelöst. Bei HAP1-Zellen wurden 75 µL, bei Fibroblasten 90 µL des Eluates zur Analyse mittels Western Blot (2.9.5 - 2.9.6) verwendet.

2.10 Statistische Analyse

Western Blot (LRP2, LMBR1L) und qPCR (*LMBR1L*) wurden dreimal durchgeführt. Verwendet wurden Proben aus drei unabhängigen Experimenten. Aus den wiederholten Durchführungen liegen für eine Zelllinie mehrere Ergebniswerte vor. Für einen Vergleich von Kontrollen und Mutanten wurde pro Kontrollzelllinie der Mittelwert aus den einzelnen Durchführungen gebildet. Hieraus entstanden die Werte der Kontrollgruppe, sodass diese

Mittelwerte einer jeweiligen Zelllinie als Datenpunkte der Kontrollen abgebildet sind. Bei der Oberflächenbiotinylierung von transfizierten HAP1-Zellen wurden die Kontrollzelllinien gleich 100 % gesetzt. Für jede untersuchte Mutante liegt nur eine Zelllinie vor. Daher wurden die Einzelwerte der Mutanten beibehalten, ein Datenpunkt ist das Ergebnis einer Durchführung. Somit soll anhand der technischen Variabilität eine annähernde Darstellung einer biologischen Variabilität ermöglicht werden. Jeweils bezogen auf den Mittelwert der Kontrollzellen als 100 % wurde das relative mRNA-/ Protein-Expressionslevel von Kontrollen und Mutanten dargestellt. Graph Pad Prism 6 (Tab. 3) wurde für statistische Tests und graphische Darstellungen verwendet. Ein Vergleich des relativen mRNA-/ Protein Levels zwischen der Kontrollgruppe und jeweiliger Mutante erfolgte mittels *t*-Test. In Abbildungen wird die Standardabweichung (\pm SD) dargestellt. ImageJ (ImageJ64, <https://imagej.net/ImageJ>, Tab. 3) wurde zur Quantifizierung der Western Blots eingesetzt, je ein Blot ist in den Abbildungen exemplarisch für die drei Ergebnisse dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Übersicht über die nachgewiesenen Genmutationen und die zugehörigen DSD-Fälle
 In elf der 16 Exome wurden Genmutationen nachgewiesen, die einem DSD-Phänotyp zugrunde liegen können. Tabelle 32 zeigt eine Übersicht der bei den DSD-Fällen nachgewiesenen Mutationen (varbank CCG, NCBI, Tab. 3) mit zugehörigen Allelfrequenzen aus varbank (CCG, Tab. 3) und gnomAD (Tab. 3). In Tabelle 33 sind zu den Mutationen die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung von AR und 5 α -Reduktase 2 (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) sowie des APOD Assay (Hornig et al., 2016) der zugehörigen Genitalhautfibroblasten dargestellt. Tabelle 34 beschreibt Genitalhautbiopsie, Phänotyp sowie Testosteronwerte der DSD-Fälle (1.8, anonymisierte Einsendung, keine datenerhebenden Personen darstellbar).

Tab. 32: Übersicht über die nachgewiesenen Mutationen mit jeweiliger Genomkoordinate im Referenzgenom hg19 (human genome 19), AIS- /AIS-ähnlichem Phänotyp (1.8, anonymisierte Einsendung) und Allelfrequenzen. * Beschriebene autosomal-dominante Ausprägung heterozygoter Mutationen (4.4.2, 4.7.4). Nach/siehe auch Marko et al., 2022

Fall & AIS (-ähnlicher) Phänotyp bei 46,XY		Genmutation und Genomkoordinate (hg19)	Allelfrequenz	
			varbank	gnomAD
1	CAIS	hemizygoter Missense-Mutation im Gen <i>AR</i> NM_000044.4:c.2566C>T (p.Arg856Cys) X: 66942785	/	/
2	CAIS	hemizygoter Missense-Mutation im Gen <i>AR</i> NM_000044.4:c.1847G>A (p.Arg616His) X: 66905930	/	5,47e-6
3	PAIS-ähnlich	heterozygoter* Missense-Mutation im Gen <i>MAP3K1</i> NM_005921.1:c.1016G>A (p.Arg339Gln) 5: 56160742	/	/
4	PAIS-ähnlich	heterozygoter Missense-Mutation im Gen <i>WWOX</i> NM_016373.3:c.1015A>T (p.Thr339Ser) 16: 78466608	/	4,01e-6
5	PAIS-ähnlich	hemizygoter Missense-Mutation im Gen <i>MAMLD1</i> NM_001177465.2:c.20G>A (p.Arg7Gln) X: 149613802	/	9,84e-6
		heterozygoter* Missense-Mutation im Gen <i>MAP3K1</i> NM_005921.1:c.374C>G (p.Thr125Ser) 5: 56111774	/	/

6	PAIS-ähnlich	homozygote Missense-Mutation im Gen <i>HSD17B3</i> NM_000197.1:c.3G>A (p.0?) 9: 99064384 heterozygote* Missense-Mutation im Gen <i>ZFPM2</i> NM_012082.3:c.959A>G (p.His320Arg) 8: 106811171 heterozygote Missense-Mutation im Gen <i>LMBR1L</i> NM_018113.3:c.115A>G (p.Ile39Val) 12: 49500786	/	7,96e-6
7	PAIS-ähnlich	heterozygote Missense-Mutation im Gen <i>KISS1</i> NM_002256.4:c.283C>T (p.Pro95Ser) 1: 204159746	/	1,55e-5
8	PAIS-ähnlich	heterozygote Missense-Mutationen im Gen <i>LRP2</i> NM_004525.2:c.5120C>T (p.Ser1707Phe) 2: 170088331 NM_004525.2:c.6256A>T (p.Thr2086Ser) 2: 170068502 NM_004525.2:c.10165A>G (p.Ile3389Val) 2: 170037962	/ 0,0004 0,0004	7,97e-5 1,37e-3 1,85e-3
9	PAIS-ähnlich	heterozygote Missense-Mutation im Gen <i>LRP2</i> NM_004525.2:c.11288A>T (p.Glu3763Val) 2: 170027153	0,0004	2,40e-4
10	PAIS-ähnlich	heterozygote Missense-Mutation im Gen <i>LMBR1L</i> NM_018113.3:c.863G>A (p.Arg288Gln) 12: 49495970	0,0005	1,10e-4
11	PAIS-ähnlich	heterozygote Missense-Mutation im Gen <i>LMBR1L</i> NM_018113.3:c.862C>T (p.Arg288Trp) 12: 49495971	/	1,06e-5

Tab. 33: Mutationsübersicht und biochemische Daten (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) der zugehörigen Genitalhautfibroblasten. B_{max} : AR-DHT-Bindung, K_D : AR-DHT-Dissoziationskonstante, 5α -Red: 5α -Reduktase 2 Aktivität. Normwerte: B_{max}/K_D :1.8/Weidemann et al., 1996, Thermostabilität: 1.8/Schönau et al., 1990, 5α -Red: 1.8/Schweikert et al., 1989. APOD Assay: APOD-Induktion für 0,1 % Serumkonditionen nach 10 nM DHT (Hornig et al., 2016). Nach/siehe auch Marko et al., 2022

Genmutation	B_{max} (fmol/mg Protein > 18)	K_D (0,22 \pm 0,08 nM)	AR- Thermo- stabilität > 60 %	5α -Red pmol/mg Protein/h > 1	APOD Assay: APOD- Induktion (\leq Cut-off)
AR, NM_000044.4: c.2566C>T (p.Arg856Cys)	keine Bindung		/	keine Aktivität	<u>0,84</u> (Cut-off 2,29)
AR, NM_000044.4: c.1847G>A (p.Arg616His)	23	0,96	69	421	<u>0,90</u> (Cut-off 2,29)
MAP3K1, NM_005921.1: c.1016G>A (p.Arg339Gln)	15	0,17	72	388	5,28 (Cut-off 2,29)

WWOX, NM_016373.3: c.1015A>T (p.Thr339Ser)	32	0,38	63	291,23	2,95 (Cut-off 2,36)
MAMLD1, NM_001177465.2: c.20G>A (p.Arg7Gln) MAP3K1, NM_005921.1: c.374C>G (p.Thr125Ser)	11	0,8	65,7	424	2,08 (Cut-off 2,36)
HSD17B3, NM_000197.1: c.3G>A (p.0?) ZFPM2, NM_012082.3: c.959A>G (p.His320Arg) LMBR1L, NM_018113.3: c.115A>G (p.Ile39Val)	34	0,16	57,48	224,36	5,18 (Cut-off 2,29)
KISS1, NM_002256.4: c.283C>T (p.Pro95Ser)	10	0,37	96	297	4,48 (Cut-off 2,29)
LRP2, NM_004525.2: c.5120C>T (p.Ser1707Phe) c.6256A>T (p.Thr2086Ser) c.10165A>G (p.Ile3389Val)	15	0,2	90	237	4,14 (Cut-off 2,29)
LRP2, NM_004525.2: c.11288A>T (p.Glu3763Val)	15	0,3	92,83	248,62	3,12 (Cut-off 2,36)
LMBR1L, NM_018113.3: c.863G>A (p.Arg288Gln)	30	0,12	61,49	372,87	5,18 (Cut-off 2,29)
LMBR1L, NM_018113.3: c.862C>T (p.Arg288Trp)	10	0,65	100	4,61	4,06 (Cut-off 2,29)

Tab. 34: Übersicht über die DSD-Fälle mit Biopsiestelle, Alter bei Biopsie (1.8, anonymisierte Einsendung), Grad der Virilisierung anhand der Sinnecker Skala (Sinnecker et al., 1997), Kurzbeschreibung des Phänotyps (CAIS-/ PAIS-ähnlich), basale und hCG-stimulierte Testosteronwerte (1.8, anonymisierte Einsendung). Nach/siehe auch Marko et al., 2022

Fall	Biopsie- stelle	Alter bei Biopsie	Sinnecker Skala	Phänotyp: Kurzbeschreibung	Testosteron: basal	Testosteron: hCG-stimuliert
1	Labia majora	36 Jahre	5	CAIS, weiblicher Phänotyp, weibliche äußere Geschlechts- organe, intraabdo- minelle Hoden	/	/
2	Labia majora	15 Monate	5	CAIS, weiblicher Phänotyp, weibliche äußere Geschlechts- organe, inguinale Hoden: Hernien	0,42 nmol/L (12 ng/dL)	6,4 nmol/L (185 ng/dL)
3	Scrotum	3 Jahre	4	PAIS-ähnlich, labien- ähnliches Scrotum	/	/

				bifidum, Hypospadie, Micropenis/Clitoromegalie, inguinale Hoden		
4	Vorhaut	10 Jahre	2	PAIS-ähnlich, Hypospadie, Gleithoden, partielle penoscrotale Transposition	/	/
5	Vorhaut	5 Jahre	2	PAIS-ähnlich, Hypospadie mit Peniskrümmung, hypoplastische Corpora cavernosa, scrotale Hoden	0,35 nmol/L (10 ng/dL)	5000 IU x 1 8,9 nmol/L (256 ng/dL)
6	Labia majora	17 Jahre	4 - 5	PAIS-ähnlich, Labia majora, Clitoromegalie, Hypospadie, rudimentäre Vagina	/	/
7	Scrotum	13 Monate	3	PAIS-ähnlich, Micropenis, Scrotum bifidum, Hypospadie, inguinale Hoden, reduziertes Hodenvolumen	0,1 nmol/L (3 ng/dL)	nach 72 h 3,1 nmol/L (88 ng/dL)
8	Scrotum	2,5 Jahre	3	PAIS-ähnlich, hypoplastisches Scrotum bifidum, Micropenis, Hypospadie, inguinale Hoden, Agenesie des Septum pellucidum	4,8 nmol/L (138 ng/dL)	750 IU x 1 Nach 24 h: 13,1 nmol/L (378 ng/dL), nach drei/fünf Tagen: 22 nmol/L (634 ng/dL)
9	Vorhaut	3 Jahre	3	PAIS-ähnlich, hypoplastisches Scrotum bifidum, Hypospadie, Micropenis, inguinale Hoden	0,49 nmol/L (14 ng/dL)	3000 IU x 1 10,8 nmol/L (311 ng/dL)
10	Scrotum	1 Monat	4	PAIS-ähnlich, Scrotum bifidum, Micropenis, Hypospadie, ein Hoden inguinal, ein Hoden nicht vorhanden	3,8 nmol/L (110 ng/dL)	/
11	Scrotum	10 Jahre	3	PAIS-ähnlich, hypoplastisches Scrotum, Micropenis, Hypospadie, inguinale Hoden	0,17 nmol/L (5 ng/dL) 0,31 nmol/L (9 ng/dL)	/

3.2 Ein CAIS-Fall mit Mutation in der Ligandenbindungsdomäne des *AR*

Für Fall 1 (bei Einsendung 36 Jahre alt) ist aus den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) die Beschreibung eines unauffälligen weiblichen Phänotyps mit weiblichen äußeren Geschlechtsorganen bei männlichem Karyotyp 46,XY zu entnehmen (Tab. 34). Weiterhin ist in den vorliegenden klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) dargestellt, dass die Abklärung einer beeinträchtigten Pubertätsentwicklung zum Nachweis intraabdomineller Hoden (Tab. 34) und nachfolgend zur klinischen Diagnose CAIS führte. Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors eine nicht nachweisbare Bindung von Dihydrotestosteron an den AR zeigte und eine Enzymaktivität der 5 α -Reduktase 2 nicht messbar war (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *AR* (NM_000044.4) die hemizygote Mutation c.2566C>T (p.Arg856Cys), (Abb. 1 A und Tab. 32). Diese *AR*-Mutation befindet sich in Exon 7 und liegt somit in der Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Androgenrezeptors (Achermann und Hughes, 2011). Eine Analyse der *AR*-Mutation p.Arg856Cys mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 35). ClinVar (Tab. 3) beurteilt die *AR*-Mutation p.Arg856Cys als pathogen („pathogenic“, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Accession: VCV000279687.2).

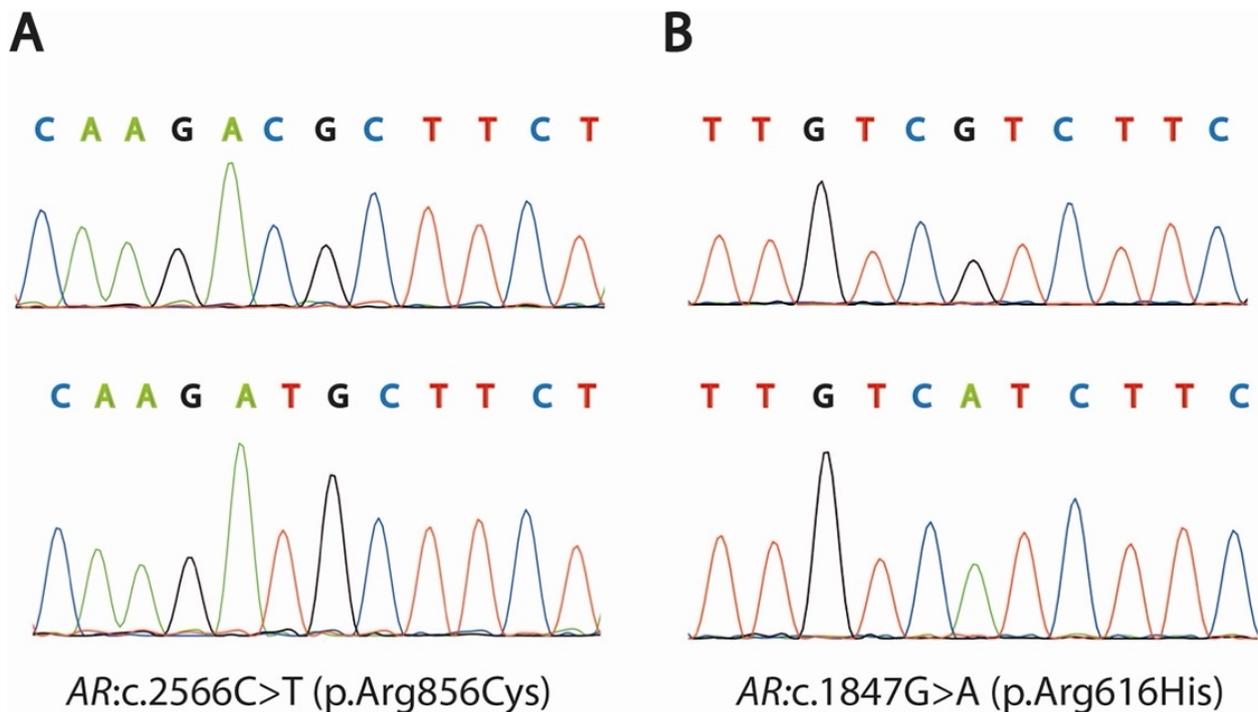


Abb. 1: Mutationen im *AR* (A) Fall 1: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den hemizygoten Basenaustausch CGC → TGC im Gen *AR*. Die Aminosäure Arginin an Position 856 wird gegen Cystein ausgetauscht. (B) Fall 2: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich zur Kontrolle bestätigt den hemizygoten Basenaustausch CGT → CAT im Gen *AR*. Die Aminosäure Arginin an Position 616 wird gegen Histidin ausgetauscht.

3.3 Ein CAIS-Fall mit Mutation in der DNA-Bindungsdomäne des *AR*

Für Fall 2 (bei Einsendung 15 Monate alt) ist aus den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) die Beschreibung eines unauffälligen weiblichen Phänotyps mit weiblichen äußeren Geschlechtsorganen bei männlichem Karyotyp 46,XY zu entnehmen (Tab. 34). Weiterhin ist in den vorliegenden klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) dargestellt, dass im Kindesalter eine Hernienoperation inguinal liegende Hoden zeigte (Tab. 34), worauf eine biochemische CAIS-Diagnostik folgte. Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit erhöhter Ligandendissoziation einen qualitativen AR-Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und

Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *AR* (NM_000044.4) die hemizygote Mutation c.1847G>A (p.Arg616His), (Abb. 1 B und Tab. 32). Diese Mutation befindet sich in Exon 3 und liegt somit in der DNA-Bindungsdomäne des Androgenrezeptors (Achemann und Hughes, 2011). Eine Analyse der *AR*-Mutation p.Arg616His mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, Mutation-Assessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 35). ClinVar (Tab. 3) beurteilt die *AR*-Mutation p.Arg616His als pathogen („pathogenic“, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Accession: VCV000279684.7). Die in den klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) vorhandenen Ergebnisse der Hormonwertbestimmungen von basalem und hCG-stimuliertem Testosteron finden sich in Tabelle 34.

Tab. 35: *AR*-Mutationen von Fall 1 und Fall 2: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 1: <i>AR</i> :c.2566C>T (p.Arg856Cys)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,62 (17,31 %)	Probably damaging 1,000	Functional impact: Medium FI Score: 3,12 VC Score: 3,60 VS Score: 2,64	Damaging -5,26	Disease- causing	Damaging 0
Fall 2: <i>AR</i> :c.1847G>A (p.Arg616His)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,62 (17,31 %)	Probably damaging 1,000	Functional impact: High FI Score: 4,5 VC Score: 6,44 VS Score: 2,56	Damaging -5,01	Disease- causing	Damaging 0

3.4 Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen *MAP3K1*

Für Fall 3 (bei Einsendung 3 Jahre alt) ist aus den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit intergeschlechtlich ausgebildeten externen Genitalorganen zu entnehmen, nach der klinischen Beschreibung liegt somit je nach männlicher/weiblicher Beschreibung der Genitalorgane ein labienähnliches Scrotum bifidum/Labia majora pudendi und ein Micropenis/eine Clitoromegalie sowie eine Hypospadie vor (Tab. 34). Weiterhin ist neben männlichen internen Genitalorganen ein rudimentär ausge-

bildeter Uterus und eine Vagina beschrieben, zudem lag bei einem Bruder von Fall 3 eine vergleichbare klinische Diagnose vor (1.8, anonymisierte Einsendung). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors eine verminderte DHT-Bindung als Hinweis auf einen quantitativen Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *MAP3K1* (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase), (NM_005921.1), die heterozygote Mutation c.1016G>A (p.Arg339Gln), (Abb. 2 A und Tab. 32). Eine Analyse der *MAP3K1*-Mutation p.Arg339Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 36). ClinVar (Tab. 3) beurteilt die *MAP3K1*-Mutation p.Arg339Gln als wahrscheinlich pathogen („likely pathogenic“, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Accession: VCV000471688.1).

Tab. 36: *MAP3K1*-Mutation von Fall 3: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 3: <i>MAP3K1</i> :c.1016G>A (p.Arg339Gln)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-1,24 (5,52 %)	Probably damaging 0,999	Functional impact: Neutral FI Score: 0,55 VC Score: 1,10 VS Score: 0	Tolerated -0,38	Disease- causing	Tolerated 0,23

3.5 Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen *WWOX*

Für Fall 4 (bei Einsendung 10 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit Hypospadie, Auffälligkeiten von Scrotum und Penis (partielle penoscrotale Transposition) sowie Gleithoden dargestellt (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit einer erhöhten Ligandendissoziation einen qualitativen AR-Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb

des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *WWOX* (WW domain-containing oxidoreductase), (NM_016373.3), die heterozygote Mutation c.1015A>T (p.Thr339Ser), (Abb. 2 B und Tab. 32). Eine Analyse der *WWOX*-Mutation p.Thr339Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung als tolerablen Aminosäureaustausch oder pathogene Mutation (Tab. 37).

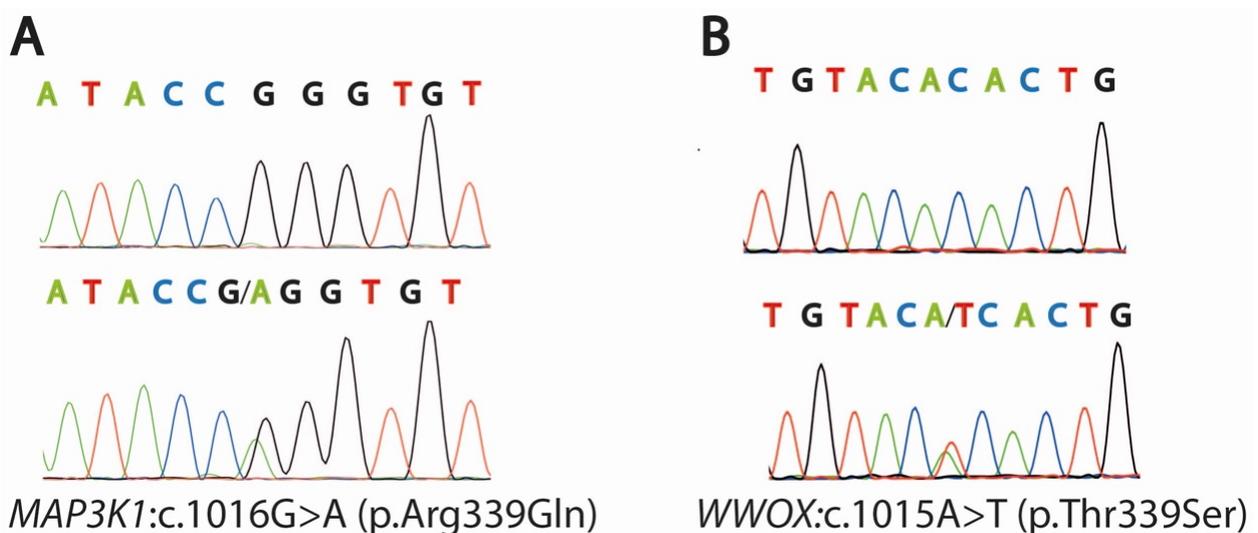


Abb. 2: (A) Fall 3: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch CGG → CAG im Gen *MAP3K1*. Die Aminosäure Arginin an Position 339 wird gegen Glutamin ausgetauscht. (B) Fall 4: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch ACA → TCA im Gen *WWOX*. Die Aminosäure Threonin an Position 339 wird gegen Serin ausgetauscht.

Tab. 37: *WWOX*-Mutation von Fall 4: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 4: <i>WWOX</i> :c.1015A>T (p.Thr339Ser)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
1,1 (91,92 %)	benign 0,009	Functional impact: Neutral FI Score: 0,15 VC Score: -0,39 VS Score: 0,69	Tolerated -1,12	Disease-causing	Tolerated 0,4

3.6 Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutationen in den Genen *MAMLD1* und *MAP3K1*

Für Fall 5 (bei Einsendung 5 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit hypoplastischen Corpora cavernosa, Penisdeviation, Hypospadie und urologischen Fehlbildungen sowie sich im Scrotum befindenden Hoden beschrieben (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit verminderter DHT-Bindung und vom Normalbereich abweichender AR-DHT-Dissoziationskonstante einen quantitativen und qualitativen AR-Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *MAMLD1* (NM_001177465.2) die hemizygote Mutation c.20G>A (p.Arg7Gln), (Abb. 3 A und Tab. 32). Eine Analyse der *MAMLD1*-Mutation p.Arg7Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 38). Eine weitere, heterozygot vorliegende, Mutation findet sich bei Fall 5 im Gen *MAP3K1* (NM_005921.1), c.374C>G (p.Thr125Ser), (Abb. 3 B und Tab. 32). Eine Analyse der *MAP3K1*-Mutation p.Thr125Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als apathogenen Aminosäureaustausch (Tab. 38). Die in den klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) vorhandenen Ergebnisse der Hormonwertbestimmungen von basalem und hCG-stimuliertem Testosteron finden sich in Tabelle 34.

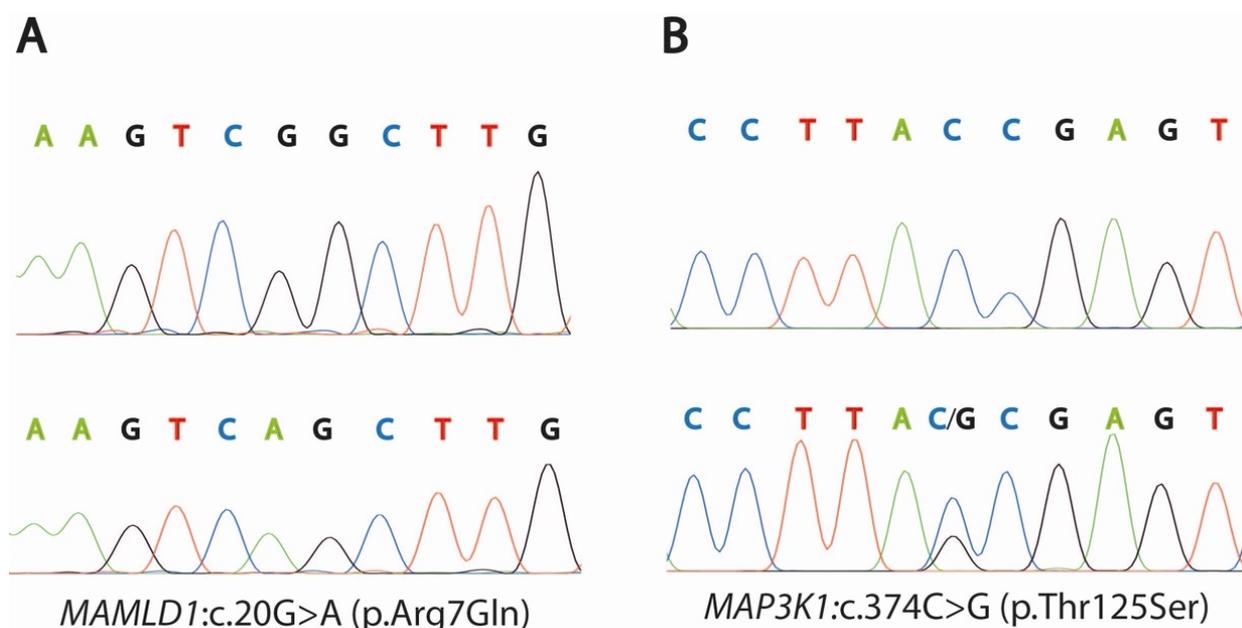


Abb. 3: Fall 5: (A) Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den hemizygoten Basenaustausch CGG → CAG im Gen *MAMLD1*. Die Aminosäure Arginin an Position 7 wird gegen Glutamin ausgetauscht. (B) Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch ACC → AGC im Gen *MAP3K1*. Die Aminosäure Threonin an Position 125 wird gegen Serin ausgetauscht.

Tab. 38: *MAMLD1*- und *MAP3K1*- Mutation von Fall 5: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 5: <i>MAMLD1</i> :c.20G>A (p.Arg7Gln)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
/	Probably damaging 0,998	Functional impact: Medium FI Score: 2,56 VC Score: 2,56 VS Score: 2,56	Tolerated -0,30	Poly-morphism	Damaging 0
Fall 5: <i>MAP3K1</i> :c.374C>G (p.Thr125Ser)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-1,24 (5,52 %)	benign 0,000	Functional impact: Neutral FI Score: 0 VC score: 0 VS Score: 0	Tolerated -0,20	Poly-morphism	Tolerated 0,85

3.7 Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutationen in den Genen *HSD17B3* und *ZFPM2*

Für Fall 6 (bei Einsendung 17 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY beschrieben, zudem ist dargestellt, dass aufgrund des überwiegend weiblich entwickelten Phänotyps ein Aufwachsen als weibliches Kind erfolgte. Weiterhin enthalten die klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) eine Charakterisierung des Phänotyps mit Clitoromegalie, perineoscrotaler Hypospadie und beidseitig in den Labia majora pudendi liegenden Hoden, es ist zudem eine rudimentäre Vagina beschrieben (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors eine leicht reduzierte Thermostabilität und somit einen leichten qualitativen AR-Bindungsdefekt (Griffin, 1979) ergab, die 5 α -Reduktase 2 wies eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs auf (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen eine homozygote Mutation im Gen *HSD17B3* (17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 3), (NM_000197.1), c.3G>A (p.0?), (Abb. 4 A und Tab. 32). Eine Analyse der *HSD17B3*-Mutation p.0? mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 39). Die Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen für Fall 6 zudem eine heterozygote Mutation im Gen *ZFPM2* (Zinc Finger Protein Member 2), (NM_012082.3), c.959A>G (p.His320Arg), (Abb. 4 B und Tab. 32). Eine Analyse der *ZFPM2*-Mutation p.His320Arg mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 39). Die Exomsequenzierung zeigt für Fall 6 zusätzlich die heterozygote Mutation c.205T>C (p.Trp69Arg) im Gen *INSL3*, das mit Kryptorchismus assoziiert ist (Audi et al., 2018). Aufgrund dieses assoziierten Phänotyps, der bei Fall 6 nicht vorliegt, wird das Gen *INSL3* nicht weiter berücksichtigt. Außerdem zeigt die Exomsequenzierung für Fall 6 die hemizygoten Mutation c.16C>A (p.His6Asn) im Gen *NR0B1*, in ClinVar (Tab. 3) findet sich für diese Mutation die Einstufung als benigne/wahrscheinlich benigne („benign/likely

benign“, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Accession: VCV000378277.3). Daher wird auch diese Genmutation in *NR0B1* für Fall 6 nicht weiter berücksichtigt.

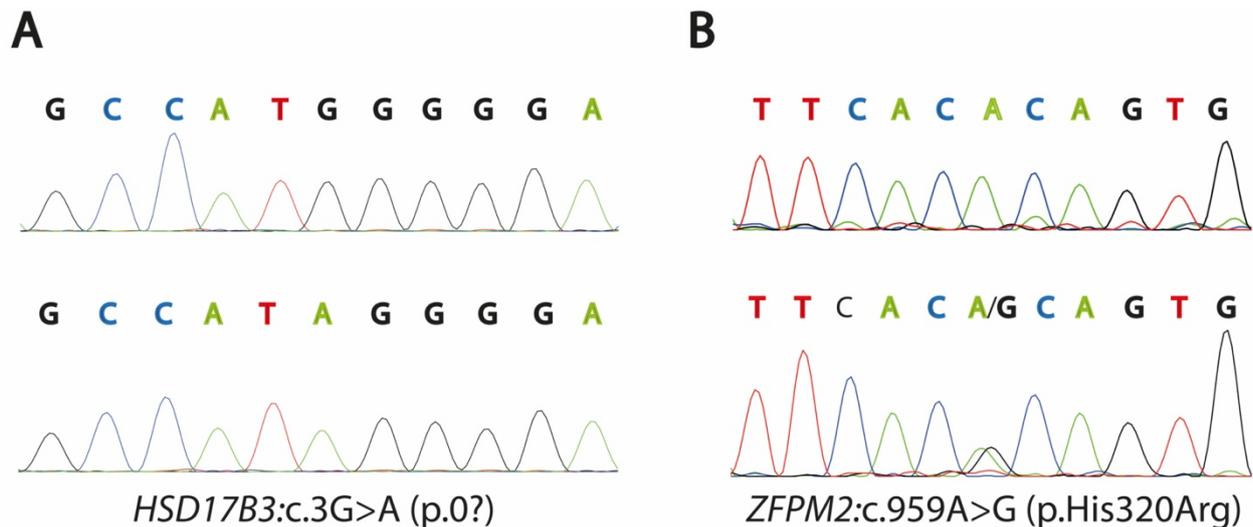


Abb. 4: Fall 6: (A) Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den homozygoten Basenaustausch ATG → ATA im Gen *HSD17B3*. Das Codon der Aminosäure Methionin an Position 1 (Startcodon) geht verloren. (B) Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch CAC → CGC im Gen *ZFPM2*. Die Aminosäure Histidin an Position 320 wird gegen Arginin ausgetauscht.

Tab. 39: *HSD17B3*- und *ZFPM2*-Mutation von Fall 6: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 6: <i>HSD17B3:c.3G>A (p.0?)</i>					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,16 (42,06 %)	benign 0,063	/	Damaging -1,86	Disease-causing	Damaging 0
Fall 6: <i>ZFPM2:c.959A>G (p.His320Arg)</i>					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
0,52 (80,37 %)	Probably damaging 0,959	Functional impact: Medium FI Score: 3,25 VC Score: 5,81 VS Score: 0,69	Tolerated -1,20	Disease-causing	Damaging 0

3.8 Ein PAIS-ähnlicher Fall mit Mutation im Gen *KISS1*

Für Fall 7 (bei Einsendung 13 Monate alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit Scrotum bifidum, perineoscrotaler Hypospadie, Micropenis und inguinal liegenden Hoden mit reduzierten Volumina beschrieben (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit verminderter DHT-Bindung und erhöhter DHT-Dissoziation einen quantitativen und qualitativen AR-Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *KISS1* (Kisspeptin), (NM_002256.4), die heterozygote Mutation c.283C>T (p.Pro95Ser), (Abb. 5 A und Tab. 32). Eine Analyse der *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 40). Die Sequenzierung der Kisspeptin-cDNA aus Genitalhautfibroblasten von Fall 7 zeigt, dass nur die Kisspeptin-cDNA mit mutierter Sequenz vorliegt (Abb. 5 B), somit nur mutierte Kisspeptin-mRNA gebildet wird. Für Fall 7 enthalten die klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) Ergebnisse von Hormonwertbestimmungen: Der gemessene Wert für Testosteron basal betrug 0,1 nmol/L (3 ng/dL), nach einem hCG (humanes Choriongonadotropin) -Test zur Stimulation der Testosteronsekretion lag nach 72 Stunden ein Testosteronwert von 3,1 nmol/L (88 ng/dL) vor (Tab. 34). Der gemessene Wert für FSH (Follikel stimulierendes Hormon) basal betrug 0,5 IU/L und für LH (Luteinisierendes Hormon) basal 0,5 IU/L, nach einem GnRH (Gonadotropin-Freisetzungshormon, Gonadotropin-Releasing-Hormon) -Test zur Stimulation der FSH- und LH-Sekretion lag ein FSH-Wert von 3,3 IU/L und ein LH-Wert von 3,2 IU/L vor (1.8, anonymisierte Einsendung).

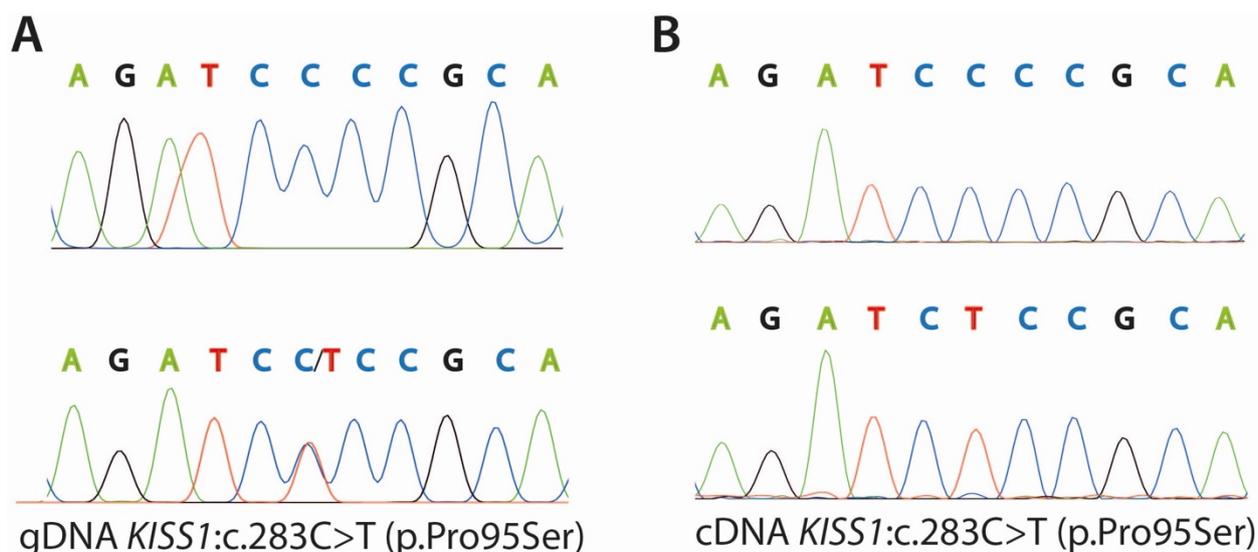


Abb. 5: Fall 7: (A) Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch CCC → TCC im Gen *KISS1*. Die Aminosäure Prolin an Position 95 wird gegen Serin ausgetauscht. (B) Die Sangersequenzierung der cDNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit cDNA einer Kontrolle bestätigt den homozygoten Basenaustausch CCC → TCC in der cDNA des Gens *KISS1*: bei Fall 7 ist nur die cDNA der *KISS1*-Mutante nachweisbar. Die Aminosäure Prolin an Position 95 wird gegen Serin ausgetauscht.

Tab. 40: *KISS1*-Mutation von Fall 7: Vergleich der Pathogenitätsanalysen

Fall 7: <i>KISS1</i> :c.283C>T (p.Pro95Ser)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
/	Possibly damaging 0,919	Functional impact: Low FI Score: 1,32 VC Score: 1,54 VS Score: 1,10	Damaging -1,68	Poly-morphism	Tolerated 0,26

3.9 Mutationen im endocytotischen Rezeptor *LRP2*/Megalyn

3.9.1 Fall 8 zeigt drei heterozygote Mutationen in *LRP2*

Für Fall 8 (bei Einsendung 2,5 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit Hypospadie, Micropenis, hypoplastischem Scrotum bifidum und inguinal liegenden Hoden beschrieben (Tab. 34). Zusätzlich ist eine Agenesie des Septum pellucidum dargestellt (Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung). Aus den

vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors durch eine reduzierte DHT-Bindung einen quantitativen AR-Bindungsdefekt zeigte und die 5 α -Reduktase 2 eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs aufwies (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen drei heterozygote Mutationen im Gen *LRP2* (Megalin), (NM_004525.2), c.5120C>T (p.Ser1707Phe) in Exon 31, c.6256A>T (p.Thr2086Ser) in Exon 37 und c.10165A>G (p.Ile3389Val) in Exon 52 (Abb. 6 A - 6 C und Tab. 32). Eine Analyse der *LRP2*-Mutationen p.Ser1707Val und p.Thr2086Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, Mutation-Assessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 41). Eine Analyse der *LRP2*-Mutation p.Ile3389Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 41). Für Fall 8 enthalten die klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) Ergebnisse von Hormonwertbestimmungen: Der gemessene Wert für Testosteron basal betrug 4,8 nmol/L (138 ng/dL), nach einem hCG-Test (einmalige Gabe, 750 IU) zur Stimulation der Testosteronsekretion lag nach 24 Stunden ein Testosteronwert von 13,1 nmol/L (378 ng/dL), nach 3 und nach 5 Tagen von 22 nmol/L (634 ng/dL) vor (Tab. 34). Die bei Fall 8 nachgewiesenen Mutationen im Gen *LRP2* wurden im Rahmen der Publikation Marko et al., 2022 in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Tab. 3) eingetragen: die *LRP2*-Mutation p.Ser1707Phe mit Accession SCV0019345574, die *LRP2*-Mutation p.Thr2086Ser mit Accession SCV0019345575 und die *LRP2*-Mutation p.Ile3389Val mit Accession SCV0019345576.

3.9.2 Fall 9 zeigt eine heterozygote Mutation in *LRP2*

Für Fall 9 (bei Einsendung 3 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit Hypospadie, Micropenis und hypoplastischem, labienähnlich ausgebildetem Scrotum bifidum sowie inguinal liegenden Hoden beschrieben (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die

biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors eine reduzierte DHT-Bindung und somit einen quantitativen AR-Bindungsdefekt zeigte, die 5 α -Reduktase 2 wies eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs auf (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *LRP2* (Megalin), (NM_004525.2), die heterozygote Mutation c.11288A>T (p.Glu3763Val), (Abb. 6 D und Tab. 32). Eine Analyse der *LRP2*-Mutation p.Glu3763Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 41). Für Fall 9 enthalten die klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) Ergebnisse von Hormonwertbestimmungen: Der gemessene Wert für Testosteron basal betrug 0,49 nmol/L (14 ng/dL), nach einem hCG-Test (einmalige Gabe, 3000 IU) zur Stimulation der Testosteronsekretion lag ein Testosteronwert von 10,8 nmol/L (311 ng/dL) vor (Tab. 34). FSH basal betrug 0,5 IU/L, LH basal 1,1 IU/L (1.8, anonymisierte Einsendung). Die bei Fall 9 nachgewiesene Mutation im Gen *LRP2* wurde im Rahmen der Publikation Marko et al., 2022 in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Tab. 3) eingetragen: p.Glu3763Val mit Accession SCV0019345577.

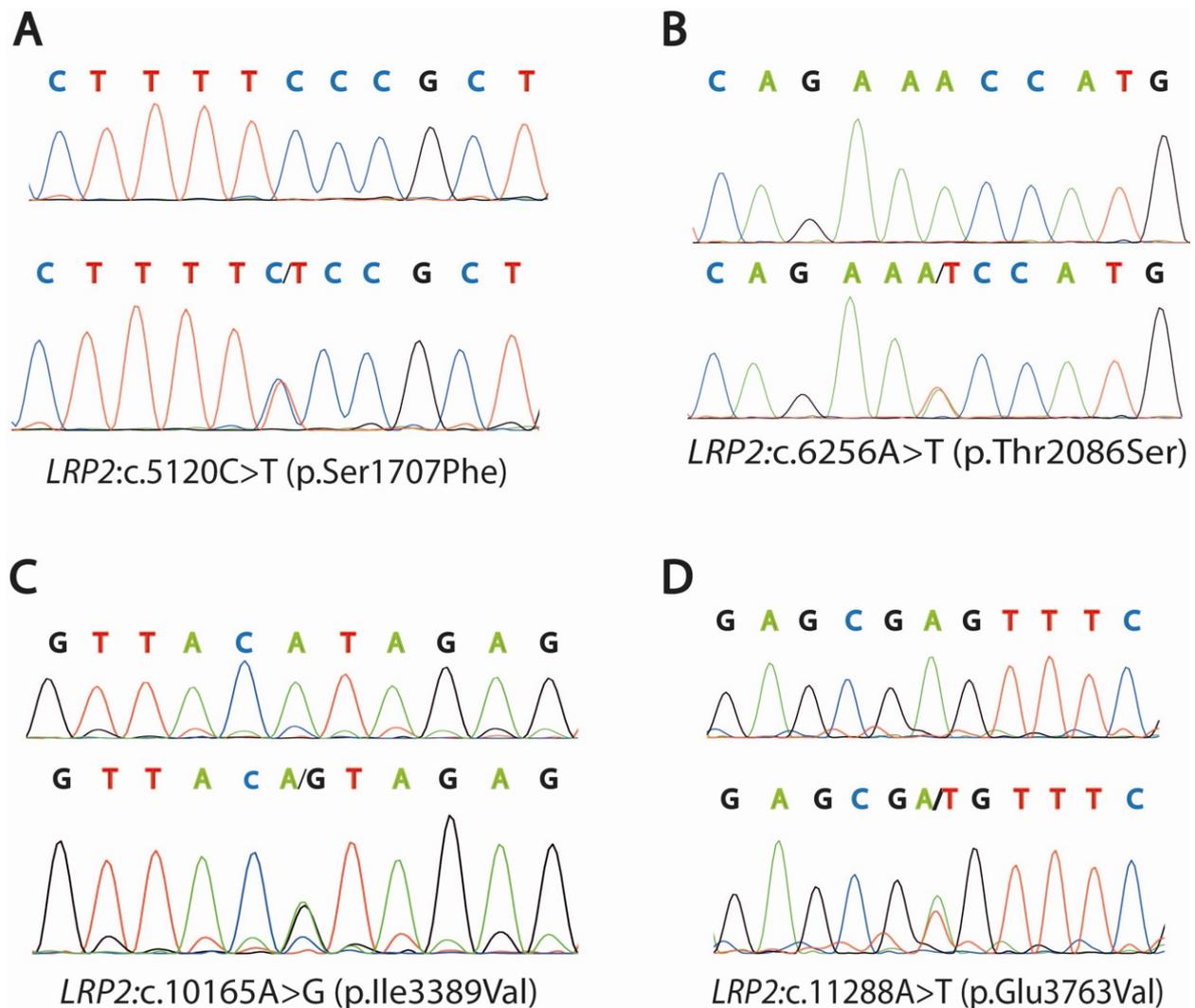


Abb. 6: *LRP2*-Mutationen bei zwei DSD-Fällen. (A - C) Fall 8: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Austausch von Basen an drei verschiedenen Positionen im Gen *LRP2*: (A) TCC → TTC. Die Aminosäure Serin an Position 1707 wird gegen Phenylalanin ausgetauscht. (B) ACC → TCC. Die Aminosäure Threonin an Position 2086 wird gegen Serin ausgetauscht. (C) ATA → GTA. Die Aminosäure Isoleucin an Position 3389 wird gegen Valin ausgetauscht. (D) Fall 9: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch GAG → GTG im Gen *LRP2*. Die Aminosäure Glutamat an Position 3763 wird gegen Valin ausgetauscht. Nach Marko et al., 2022

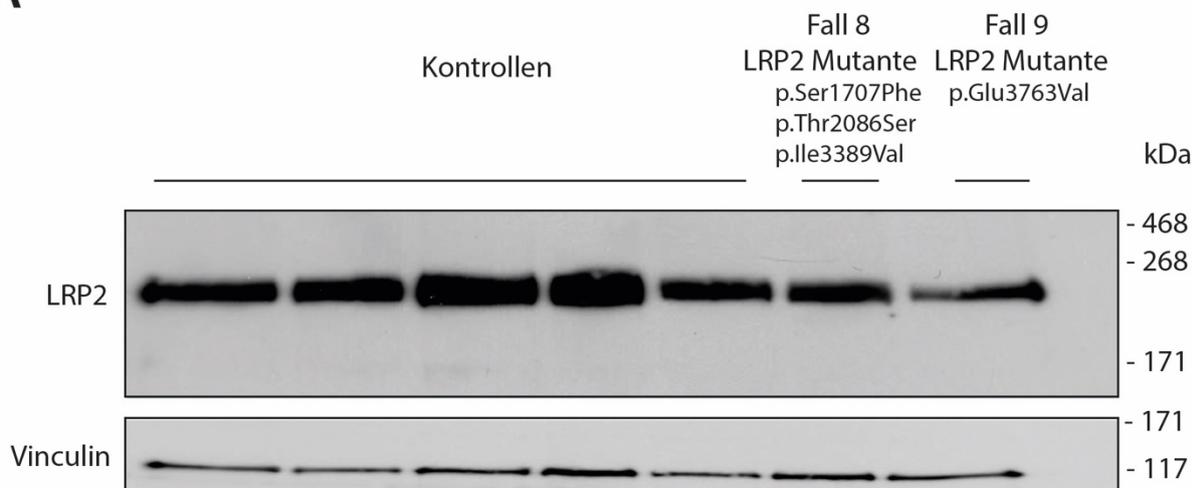
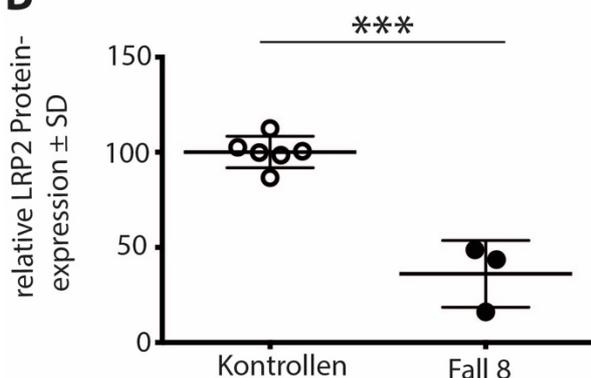
Tab. 41: LRP2-Mutationen Fall 8 und Fall 9: Vergleich der Pathogenitätsanalysen. Nach/siehe auch Marko et al., 2022

Fall 8: LRP2:c.5120C>T (p.Ser1707Phe)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
3,32 (99,42 %)	benign 0,108	Functional impact: Medium FI Score: 2,93 VC Score: 3,66 VS Score: 2,20	Damaging -3,81	Poly-morphism	Tolerated 0,1
Fall 8: LRP2:c.6256A>T (p.Thr2086Ser)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
3,32 (99,42 %)	benign 0,001	Functional impact: Neutral FI Score: -0,935 VC Score: -1,18 VS Score: -0,69	Damaging -2,73	Poly-morphism	Damaging 0,05
Fall 8: LRP2:c.10165A>G (p.Ile3389Val)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
3,32 (99,42 %)	Probably damaging 0,998	Functional impact: Medium FI Score: 2,035 VC Score: 2,12 VS Score: 1,95	Damaging -3,08	Disease-causing	Damaging 0,02
Fall 9: LRP2:c.11288A>T (p.Glu3763Val)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
3,32 (99,42 %)	Probably damaging 1,000	Functional impact: Medium FI Score: 2,515 VC Score: 3,93 VS Score: 1,10	Damaging -3,95	Disease-causing	Damaging 0

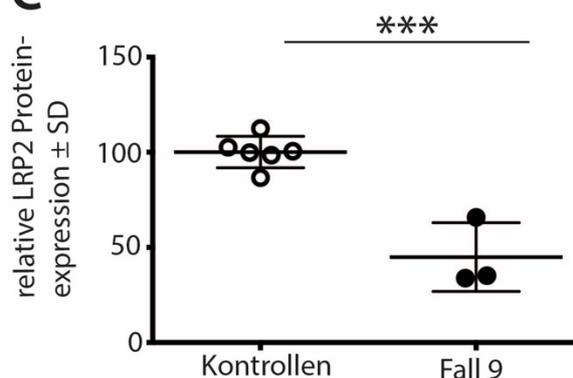
3.9.3 LRP2-Mutationen reduzieren die LRP2-Proteinexpression

Aus Genitalhautfibroblasten isolierte Membranproteinfraktionen wurden verwendet, um die Proteinexpression von LRP2 in Zellen der DSD-Fälle 8 und 9 mit Kontrollen ohne DSD-Phänotyp zu vergleichen (Abb. 7 A). Die Quantifizierung der Proteinexpression zeigt, dass die Kombination der drei heterozygoten Mutationen bei Fall 8 (Abb. 6 A - 6 C) zu einer signifikanten Reduktion der LRP2-Proteinexpression um circa 65 % führt (Abb. 7 B). Die heterozygote Mutation in Fall 9 (Abb. 6 D) reduziert die LRP2-Proteinexpression

signifikant um circa 55 % (Abb. 7 C). Das Molekulargewicht von Megalin ist circa 500 kDa (Saito et al., 1994 und Orlando et al., 1992). Der erste Nachweis von Megalin im Western Blot zeigt ein Molekulargewicht von 330 kDa (Kerjaschki und Farquhar, 1983). Das Molekulargewicht des in Fibroblasten vorkommenden Megalins in meinem SDS-Gel liegt zwischen 200 und 250 kDa (Abb. 7 A). Ein vergleichbares Molekulargewicht für Megalin im Western Blot wurde auch von anderen publiziert (Anzenberger et al., 2006 und Petersen et al., 2003 und Willnow et al., 1992).

A**B**

LRP2 Mutante
p.Ser1707Phe | p.Thr2086Ser | p.Ile3389Val

C

LRP2 Mutante
p.Glu3763Val

Abb. 7: (A) Vergleich der Proteinexpression von LRP2 in Genitalhautfibroblasten der Fälle 8 und 9 mit 5 - 6 Kontrollen ohne DSD-Phänotyp. Pro Zelllinie wurden 40 μ g Membranprotein verwendet und mittels Western Blot überprüft. Vinculin stellt die Ladungskontrolle dar. Das Experiment wurde dreimal wiederholt. Verwendet wurden Proben aus unabhängigen Experimenten. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt. (B+C) Die Quantifizierung aller drei Western Blots ergibt eine verringerte Expression der LRP2-Mutanten um 65 % bei Fall 8 (B) und um 55 % bei Fall 9 (C). Für jede der Kontrollzelllinien wurde aus den wiederholten Durchführungen der Mittelwert gebildet. Diese Mittelwerte sind als Datenpunkte der Kontrollen abgebildet. Für jede der Mutanten liegt eine Zelllinie vor, daher ist ein Datenpunkt das Ergebnis einer Durchführung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, *** $p < 0,001$. SD: Standardabweichung. Nach Marko et al., 2022

3.10 Mutationen im endocytotischen Rezeptor *LMBR1L* (Limb Development Membrane Protein 1 Like) / Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor/kurz: Lipocalinrezeptor 1

3.10.1 Fall 10 zeigt eine heterozygote Mutation im Gen *LMBR1L*

Für Fall 10 (bei Einsendung 1 Monat alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines männlich entwickelten Phänotyps mit intergeschlechtlich ausgebildeten externen Genitalorganen beschrieben (Tab. 34). Den vorliegenden klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) ist ein Scrotum bifidum, eine Hypospadie und ein Micropenis sowie ein sich inguinal befindender und ein nicht nachweisbarer Hoden zu entnehmen (Tab. 34). Zudem wird eine rudimentäre Vagina beschrieben (1.8, anonymisierte Einsendung). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit einer vom Normalbereich abweichenden AR-DHT-Dissoziationskonstante einen qualitativen AR-Bindungsdefekt ergab, die 5 α -Reduktase 2 wies eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs auf (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *LMBR1L* (Limb Development Membrane Protein 1 Like) /Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor, (NM_018113.3), die heterozygote Mutation c.863G>A (p.Arg288Gln), (Abb. 8 A und Tab. 32). Eine Analyse der *LMBR1L*-Mutation p.Arg288Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einstufung als apathogenen Aminosäureaustausch (Tab. 42). Für Fall 10 enthalten die klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) Ergebnisse von Hormonwertbestimmungen: Der gemessene Wert für Testosteron basal betrug 3,8 nmol/L (110 ng/dL), (Tab. 34). Die bei Fall 10 nachgewiesene Mutation im Gen *LMBR1L* wurde im Rahmen der Publikation Marko et al., 2022 in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Tab. 3) eingetragen: p.Arg288Gln mit Accession SCV0019345578.

3.10.2 Fall 11 zeigt eine heterozygote Mutation im Gen *LMBR1L*

Für Fall 11 (bei Einsendung 10 Jahre alt) ist in den vorhandenen klinischen Daten (1.8, anonymisierte Einsendung) das Vorliegen des männlichen Karyotyps 46,XY sowie eines

männlich entwickelten Phänotyps mit Micropenis, Hypospadie, hypoplastischem Scrotum und inguinal liegenden Hoden beschrieben (Tab. 34). Aus den vorhandenen biochemischen Daten ist zu entnehmen, dass die biochemische Charakterisierung des Androgenrezeptors mit reduzierter DHT-Bindung und erhöhter Ligandendissoziation einen quantitativen und qualitativen AR-Bindungsdefekt zeigte, die 5 α -Reduktase 2 wies eine Enzymaktivität innerhalb des Referenzbereichs auf (Tab. 33), (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert und Schönau et al., 1990 und Schweikert et al., 1989 und Weidemann et al., 1996). Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zeigen im Gen *LMBR1L* (Limb Development Membrane Protein 1 Like) /Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor, (NM_018113.3) die heterozygote Mutation c.862C>T (p.Arg288Trp), (Abb. 8 B und Tab. 32). Eine Analyse der *LMBR1L*-Mutation p.Arg288Trp mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 42). Für Fall 11 enthalten die klinischen Informationen (1.8, anonymisierte Einsendung) Ergebnisse von Hormonwertbestimmungen: Der gemessene Wert für Testosteron basal betrug 0,17 nmol/L (5 ng/dL) (Tab. 34). FSH basal betrug 1,6 IU/L, LH basal 2,2 IU/L, im GnRH-Test zeigte sich ein FSH-Wert von 3,9 IU/L und ein LH-Wert von 6,5 IU/L (1.8, anonymisierte Einsendung). Die bei Fall 11 nachgewiesene Mutation im Gen *LMBR1L* wurde im Rahmen der Publikation Marko et al., 2022 in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Tab. 3) eingetragen: p.Arg288Trp mit Accession SCV0019345579.

3.10.3 Fall 6 zeigt zusätzlich eine heterozygote Mutation im Gen *LMBR1L*

Bei Fall 6 ist mittels Exomsequenzierung und Sangersequenzierung zusätzlich zu Mutationen in *HSD17B3* und *ZFPM2* (3.7, Abb. 4, Tab. 32) im Gen *LMBR1L* (Limb Development Membrane Protein 1 Like) /Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor, (NM_018113.3) die heterozygote Mutation c.115A>G (p.Ile39Val) nachweisbar (Abb. 8 C und Tab. 32). Eine Analyse der *LMBR1L*-Mutation p.Ile39Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm, MutationTaster (Tab. 3) ergibt je nach Analysetool eine Einstufung von/zwischen tolerablem Aminosäureaustausch und pathogener Mutation (Tab. 42). Die Charakterisierung von Fall 6 findet sich in 3.7. Die bei Fall 6 nachgewiesene Mutation im Gen *LMBR1L* wurde im Rahmen der Publikation Marko et

al., 2022 in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Tab. 3) eingetragen: p.Ile39Val mit Accession SCV0019345580.

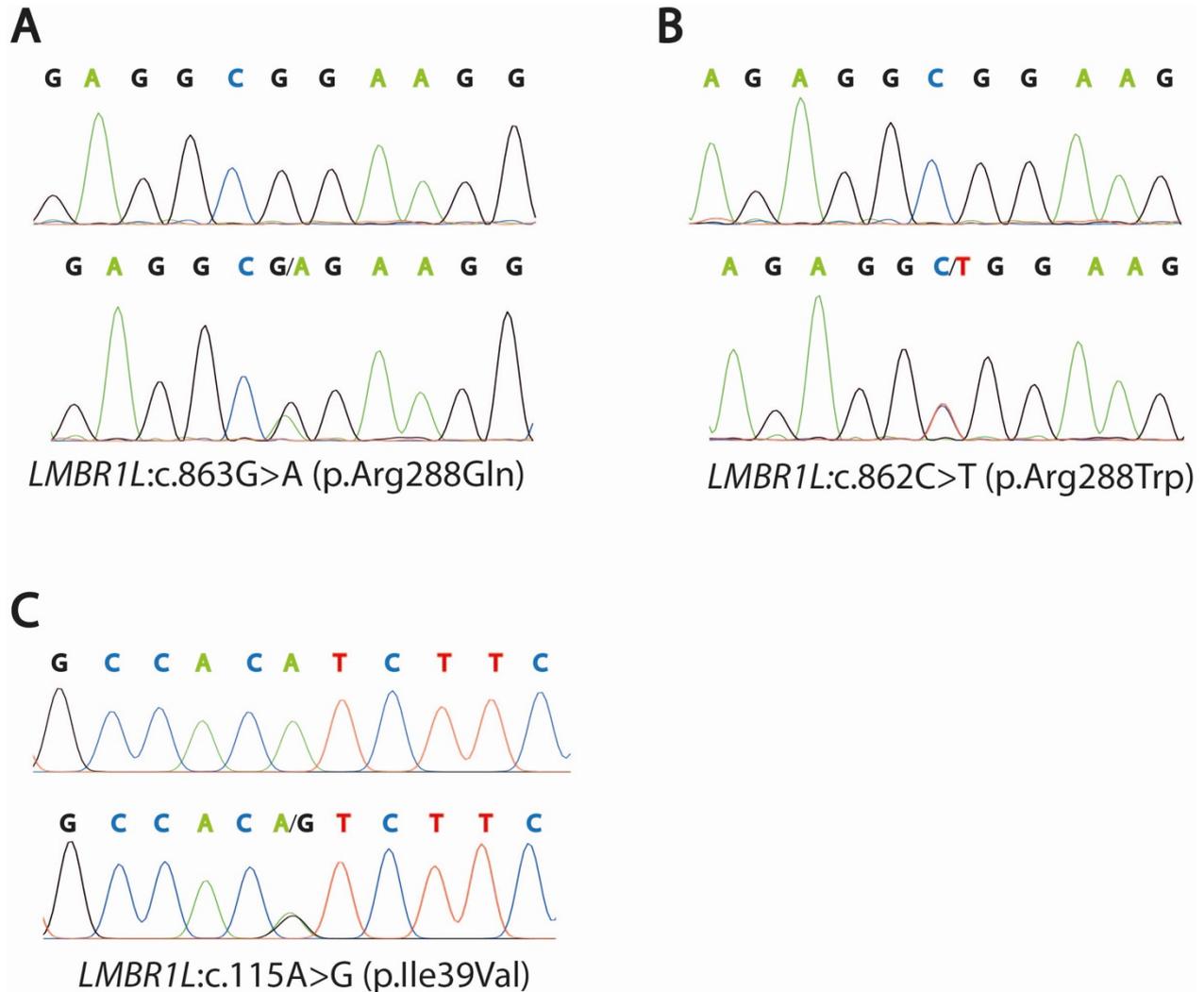


Abb. 8: Mutationsnachweise *LMBR1L* (A) Fall 10: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch CGG → CAG im Gen *LMBR1L*. Die Aminosäure Arginin an Position 288 wird gegen Glutamin ausgetauscht. (B) Fall 11: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch CGG → TGG im Gen *LMBR1L*. Die Aminosäure Arginin an Position 288 wird gegen Tryptophan ausgetauscht. (C) Fall 6: Die Sangersequenzierung der genomischen DNA aus Genitalhautfibroblasten im Vergleich mit genomischer DNA einer Kontrolle bestätigt den heterozygoten Basenaustausch ATC → GTC im Gen *LMBR1L*. Die Aminosäure Isoleucin an Position 39 wird gegen Valin ausgetauscht. Nach Marko et al., 2022

Tab. 42: *LMBR1L*-Mutationen von Fall 6, Fall 10, Fall 11: Vergleich der Pathogenitätsanalysen. Nach/siehe auch Marko et al., 2022

Fall 10: <i>LMBR1L</i> :c.863G>A (p.Arg288Gln)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,65 (16,44 %)	benign 0,000	Functional impact: Low FI Score: 0,895 VC Score: 1,28 VS Score: 0,51	Tolerated 1,44	Poly-morphism	Tolerated 0,42
Fall 11: <i>LMBR1L</i> :c.862C>T (p.Arg288Trp)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,65 (16,44 %)	Probably damaging 0,964	Functional impact: Medium FI Score: 2,25 VC Score: 2,89 VS Score: 1,61	Tolerated 1,55	Poly-morphism	Damaging 0,01
Fall 6: <i>LMBR1L</i> :c.115A>G (p.Ile39Val)					
RVIS	PolyPhen-2	MutationAssessor	fathmm	Mutation-Taster2	SIFT
-0,65 (16,44 %)	benign 0,000	Functional impact: Low FI Score: 1,01 VC Score: 0,92 VS Score: 1,10	Tolerated 1,47	Disease-causing	Tolerated 0,07

3.10.4 In der *LMBR1L* cDNA sind p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val heterozygot nachweisbar

Aus Genitalhautfibroblasten isolierte RNA der Fälle 10 (p.Arg288Gln), 11 (p.Arg288Trp) und 6 (p.Ile39Val) wurde zur cDNA-Synthese verwendet, um mittels Sangersequenzierung die jeweilige *LMBR1L*-Mutation innerhalb der cDNA darstellen zu können. Bei Fall 10 liegt die *LMBR1L*-Mutation p.Arg288Gln in der cDNA heterozygot vor (Abb. 9 A). Bei Fall 11 ist die *LMBR1L*-Mutation p.Arg288Trp in der cDNA heterozygot nachweisbar (Abb. 9 B). Bei Fall 6 ist die *LMBR1L*-Mutation p.Ile39Val in der cDNA ebenfalls heterozygot nachweisbar (Abb. 9 C).

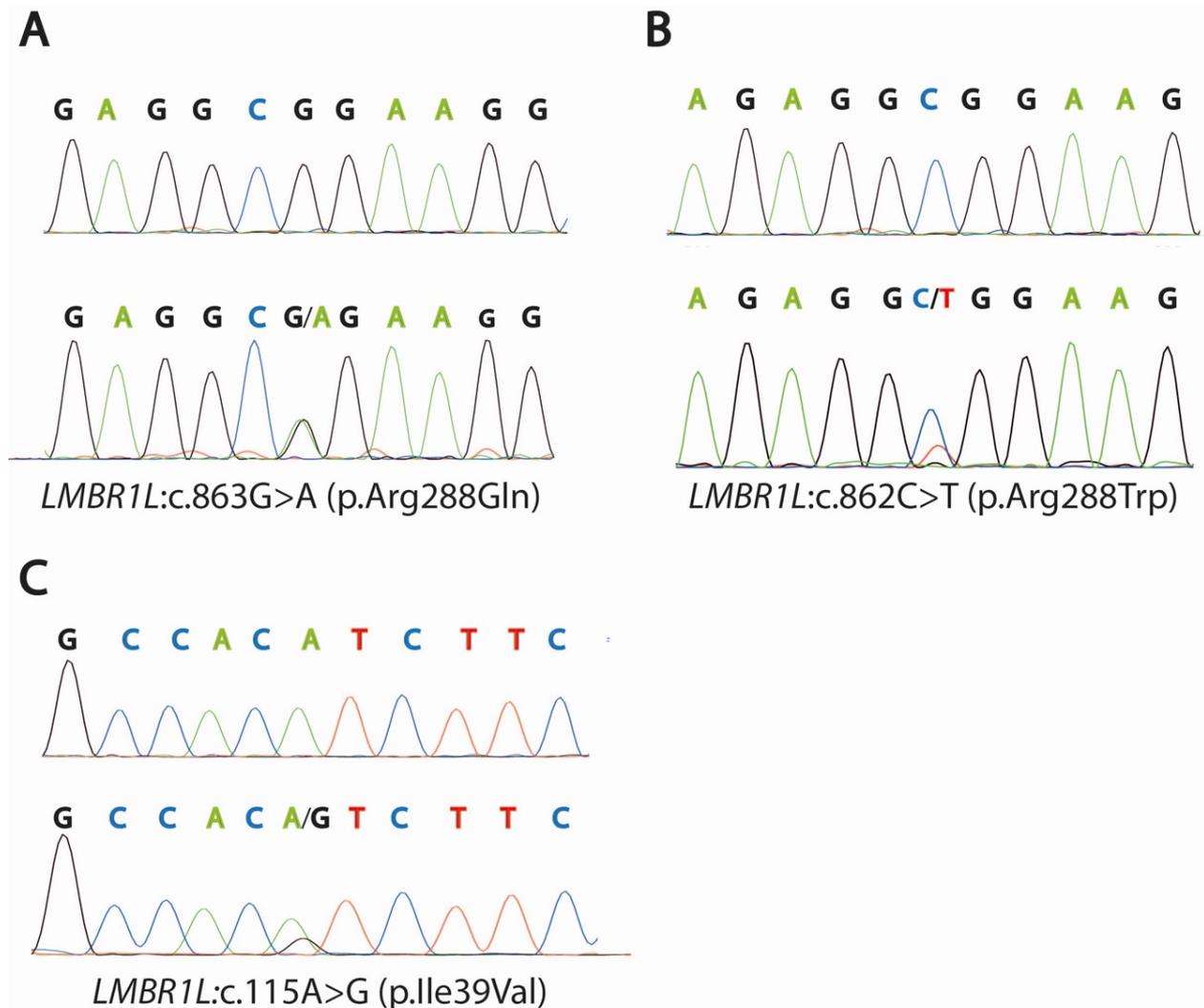


Abb. 9: Sangersequenzierung der *LMBR1L*-cDNA (A) Fall 10: Die Sangersequenzierung der cDNA aus Genitalhautfibroblasten zeigt im Vergleich mit der cDNA einer Kontrolle den in der cDNA heterozygot vorliegenden Basenaustausch CGG → CAG. (B) Fall 11: Die Sangersequenzierung der cDNA aus Genitalhautfibroblasten zeigt im Vergleich mit der cDNA einer Kontrolle den in der cDNA heterozygot vorliegenden Basenaustausch CGG → TGG. (C) Fall 6: Die Sangersequenzierung der cDNA aus Genitalhautfibroblasten zeigt im Vergleich mit der cDNA einer Kontrolle den in der cDNA heterozygot vorliegenden Basenaustausch ATC → GTC.

3.10.5 *LMBR1L*-Mutationen beeinflussen die *LMBR1L*-mRNA-Spiegel

Aus Genitalhautfibroblasten isolierte RNA der Fälle 6, 10, 11 sowie aus Kontrollfibroblasten isolierte RNA wurden zur cDNA-Synthese verwendet, um durch qRT-PCR auf die vorliegenden *LMBR1L*-mRNA-Spiegel rückschließen zu können. Die mRNA-Spiegel der Genitalhautfibroblasten der Fälle 6, 10, 11 wurden mit den mRNA-Spiegeln der Kontrollfibroblasten verglichen. Durch semiquantitative Analyse konnte gezeigt werden,

dass in den Fibroblasten der heterozygoten Mutante p.Arg288Gln von Fall 10 eine signifikante Reduktion des *LMBR1L*-mRNA-Levels um im Mittel circa 55 % vorliegt (Abb. 10 A). In den Fibroblasten der heterozygoten Mutation p.Arg288Trp von Fall 11 sind im Mittel um circa 55 % signifikant erhöhte *LMBR1L*-mRNA-Level nachweisbar (Abb. 10 B). Die heterozygote Mutation p.Ile39Val von Fall 6 zeigt keine signifikante Veränderung des *LMBR1L*-mRNA-Spiegels (Abb. 10 C).

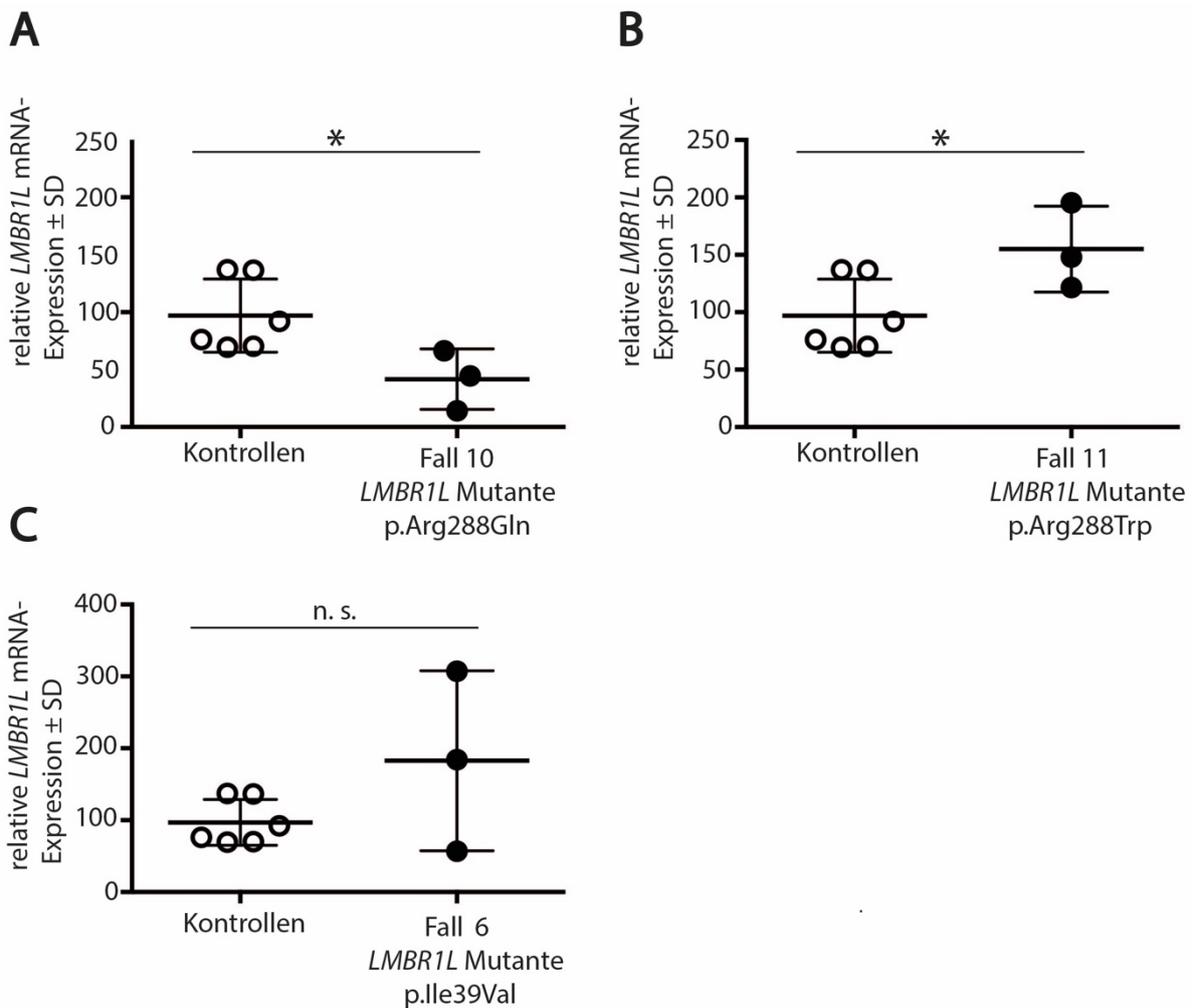


Abb. 10: mRNA-Spiegel von *LMBR1L* in Genitalhautfibroblasten: Vergleich des *LMBR1L*-mRNA-Levels von sechs verschiedenen Kontrollzelllinien mit drei *LMBR1L*-Mutanten. *18S rRNA* wurde zum Normalisieren verwendet. (A) Bei Fall 10 (p.Arg288Gln) ist das *LMBR1L*-mRNA-Level im Mittel um circa 55 % reduziert. (B) Bei Fall 11 (p.Arg288Trp) ist das *LMBR1L*-mRNA-Level im Mittel um circa 55 % erhöht. (C) Bei Fall 6 (p.Ile39Val) ist das *LMBR1L*-mRNA-Level nicht signifikant verändert. Für jede Messung wurden Triplikate verwendet. Die qRT-PCR wurde dreimal durchgeführt, eingesetzt wurden Proben aus drei unabhängigen Experimenten. Für jede der sechs Kontrollzelllinien wurde aus den drei Durchführungen der Mittelwert gebildet. Diese sechs Mittelwerte sind als Datenpunkte der Kontrollen abgebildet. Für jede der drei Mutanten liegt eine Zelllinie vor, daher ist ein Datenpunkt das Ergebnis einer Durchführung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, * $p < 0,05$. SD: Standardabweichung. n. s.: nicht signifikant. Nach Marko et al., 2022

3.10.6 DHT-Stimulation der Fibroblasten kann die *LMBR1L*-mRNA-Expression anheben
Um zu überprüfen, ob *LMBR1L* ein Zielgen des AR ist bzw. ob die *LMBR1L*-Expression durch DHT stimuliert werden kann, habe ich die Auswirkung einer DHT-Stimulation von

Genitalhautfibroblasten auf das *LMBR1L*-mRNA-Level analysiert. Hierzu wurden vier Gruppen mit zu testenden Genitalhautfibroblasten gebildet. Die erste Gruppe bestand aus Fibroblasten von sechs Kontrollen ohne DSD-Phänotyp. An diesen sollte getestet werden, ob bei anzunehmender physiologischer intrazellulärer Androgenkonzentration eine Erhöhung des *LMBR1L*-mRNA-Levels bei experimenteller DHT-Stimulation erfolgt. Genitalhautfibroblasten mit *AR*-Mutationen wurden zwischen Mutationen in LBD oder DBD unterschieden, sodass die zweite Gruppe Fibroblasten von DSD-Fällen mit Mutationen in der LBD des *AR* und die dritte Gruppe Fibroblasten von DSD-Fällen mit Mutationen in der DBD des *AR* enthielt. Fibroblasten mit Mutationen in der DBD des *AR* sollten eine Negativkontrolle darstellen, da bei defekter DNA-Bindung die *AR*-vermittelte Genexpression beeinträchtigt ist (Achermann und Hughes, 2011) und somit die *LMBR1L*-mRNA-Level nach DHT-Stimulation unverändert bleiben sollten. Fibroblasten mit Mutationen in der LBD des *AR* sollten eine Positivkontrolle darstellen, da bei defekter Ligandenbindung die *AR*-vermittelte Genexpression durch Erhöhung der Ligandenkonzentration kompensiert werden könnte und somit die *LMBR1L*-mRNA-Level nach DHT-Stimulation ansteigen sollten. Die vierte Gruppe wurde aus Fibroblasten von Individuen mit Mutationen in einem Enzym der Testosteronsynthese, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 3 (*HSD17B3*) (Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie), gebildet. Hierfür sollte getestet werden, ob bei möglicherweise mutationsbedingt beeinträchtigter Testosteronsynthese (Andersson et al., 1996) und daher anzunehmender reduzierter (intrazellulärer) Androgenkonzentration nach experimenteller DHT-Zufuhr eine Steigerung der *LMBR1L*-Expression erfolgt. Jede Zelllinie wurde zu einer Hälfte in Medium mit DHT und zur anderen Hälfte in hormonfreiem Medium inkubiert. Aus Fibroblasten isolierte RNA wurde zur cDNA-Synthese verwendet, um durch qRT-PCR auf die vorliegenden *LMBR1L*-mRNA-Spiegel rückschließen zu können. Ein Vergleich der *LMBR1L*-mRNA-Level erfolgte zwischen der in DHT-haltigem Zellmedium inkubierten Untergruppe und der in hormonfreiem Zellmedium inkubierten Untergruppen einer Zelllinie. Für die sechs Kontrollzelllinien sowie für die drei Zelllinien mit *HSD17B3*-Mutation sind die *LMBR1L*-mRNA-Level nach DHT-Stimulation vergleichbar mit den *LMBR1L*-mRNA-Levels nach hormonfreier Inkubation (Abb. 11 A, Abb. 11 B). Von drei Genitalhautfibroblastenlinien mit Mutationen in der LBD des *AR* zeigen zwei Zelllinien nach DHT-Inkubation im Vergleich zur hormonfreien Inkubation eine Erhöhung des *LMBR1L*-mRNA-

Levels, eine Zelllinie zeigt vergleichbare *LMBR1L*-mRNA-Level (Abb. 11 C). Von drei Fibroblastenlinien mit Mutationen in der LBD des *AR* zeigt nach DHT-Inkubation im Vergleich zur hormonfreien Inkubation eine Zelllinie eine Steigerung der *LMBR1L*-mRNA-Level, zwei Zelllinien zeigen vergleichbare *LMBR1L*-mRNA-Level (Abb. 11 D).

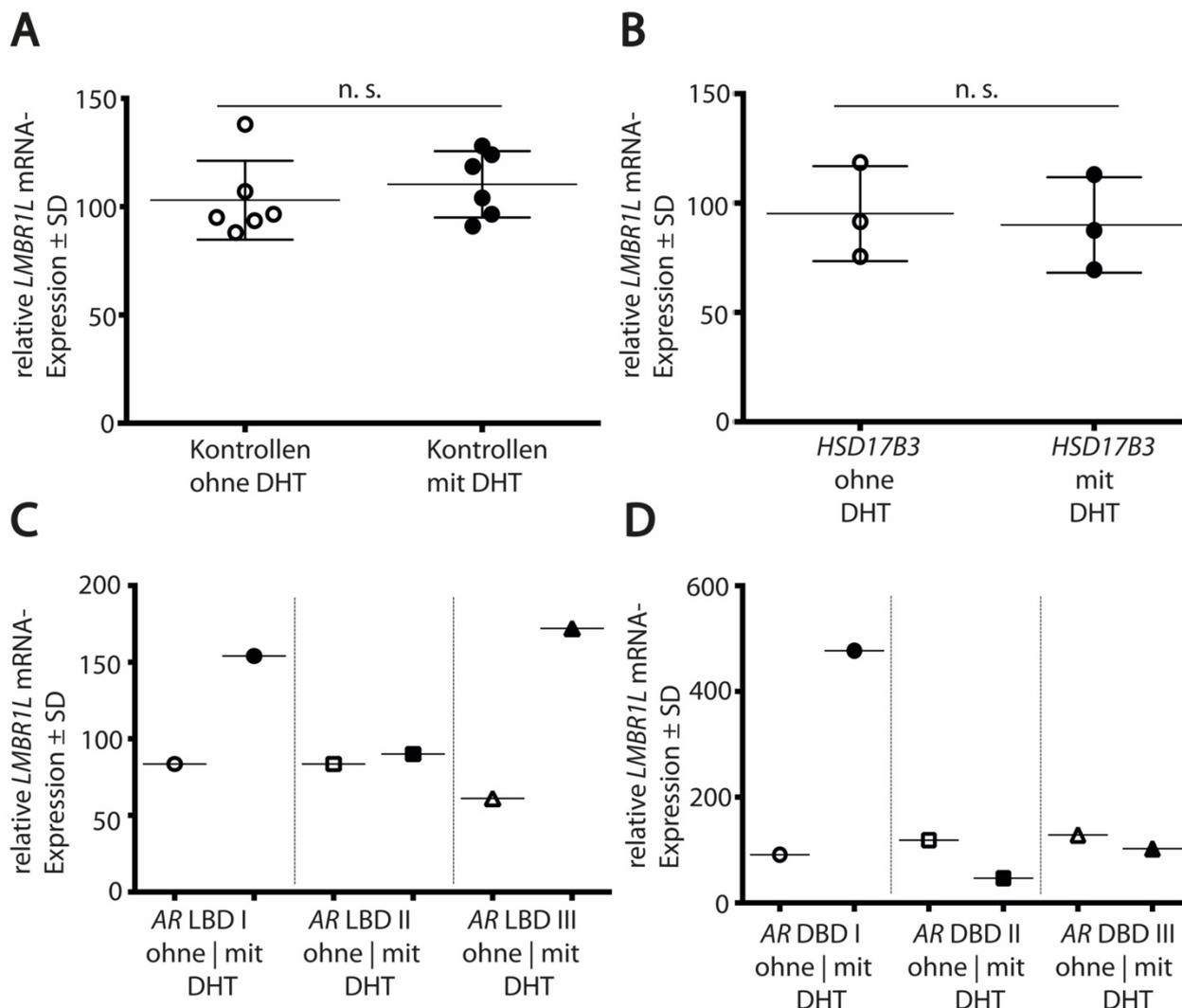


Abb. 11: *LMBR1L*-mRNA-Level ohne und mit DHT-Stimulation (10 nM). (A) Bei sechs Kontrollfibroblastenlinien ohne DSD erhöht eine Inkubation mit DHT das Level der *LMBR1L*-mRNA nicht signifikant. (B) Drei Genitalhautfibroblastenlinien mit Mutationen in *HSD17B3* zeigen keine signifikante Steigerung der *LMBR1L*-mRNA-Level durch Inkubation mit DHT. (C) Von drei Zelllinien mit Mutationen in der LBD des *AR* zeigen bei DHT-Stimulation zwei Zelllinien eine Steigerung der *LMBR1L*-mRNA-Level, eine Zelllinie zeigt vergleichbare *LMBR1L*-mRNA-Level. (D) Von drei Zelllinien mit Mutationen in der DBD des *AR* zeigt bei DHT-Stimulation eine Zelllinie eine Erhöhung der *LMBR1L*-mRNA-Level, zwei Zelllinien zeigen ähnliche *LMBR1L*-mRNA-Level. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei oder mehr Messungen, die jeweils als Triplikate durchgeführt wurden. Verwendet wurden Proben aus unabhängigen Experimenten. Die statistische

Auswertung erfolgte mittels *t*-Test. LBD: Ligandenbindungsdomäne. DBD: DNA-Bindungsdomäne. *HSD17B3*: 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 3. n. s.: nicht signifikant.

3.10.7 Auswirkung von *LMBR1L*-Mutationen auf die Oberflächenexpression des Rezeptors

Um die potenziellen Auswirkungen der *LMBR1L*-Mutationen auf die Expression des Rezeptors in einem kontrollierbaren System zu charakterisieren, klonierte ich den *LMBR1L*-Wildtyp sowie *LMBR1L* mit den Mutationen der DSD-Fälle 6, 10 und 11 (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 32). Mit kloniertem *LMBR1L*-WT und klonierten *LMBR1L*-Mutanten erfolgte die Analyse der Expression in Abhängigkeit von den jeweiligen Mutationen auf Ebene der Proteinexpression in transfizierten Zellen.

3.10.7.1 Expression von *LMBR1L* mit HA-Tag in HEK293-Zellen

LMBR1L-Plasmid-DNA mit der Sequenz für ein N- bzw. C-terminales HA-Tag wurde transient in HEK293-Zellen transfiziert. Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Membranproteinfraktion. Sowohl N- als auch C-terminal getaggte *LMBR1L* sind in der zellulären Membranproteinfraktion zu finden und zeigen jeweils ein Molekulargewicht von circa 40 kDa (Abb. 12 A). Dies weist darauf hin, dass ein angefügtes HA-Tag weder am C-Terminus noch am N-Terminus zu einer Beeinträchtigung der *LMBR1L*-Proteinexpression führt (Abb. 12 A). Für die Analyse der *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val verwendete ich die C-terminal getaggte Variante. Plasmid-DNA der *LMBR1L*-Mutanten mit C-terminalem HA-Tag wurde transient in HEK293-Zellen transfiziert. Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Membranproteinfraktion. Die *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val können von HEK293-Zellen gebildet werden (Abb. 12 B). Die drei Mutanten sind in der zellulären Membranproteinfraktion zu finden und zeigen jeweils ein Molekulargewicht von circa 40 kDa (Abb. 12 B). Als Positivkontrolle wurden mit Plasmid-DNA des *LMBR1L*-Wildtyps transient transfizierte HEK293-Zellen verwendet, um einen möglichen Einfluss der Mutationen auf das Molekulargewicht der mutierten *LMBR1L* erkennen zu können (Abb. 12 B).

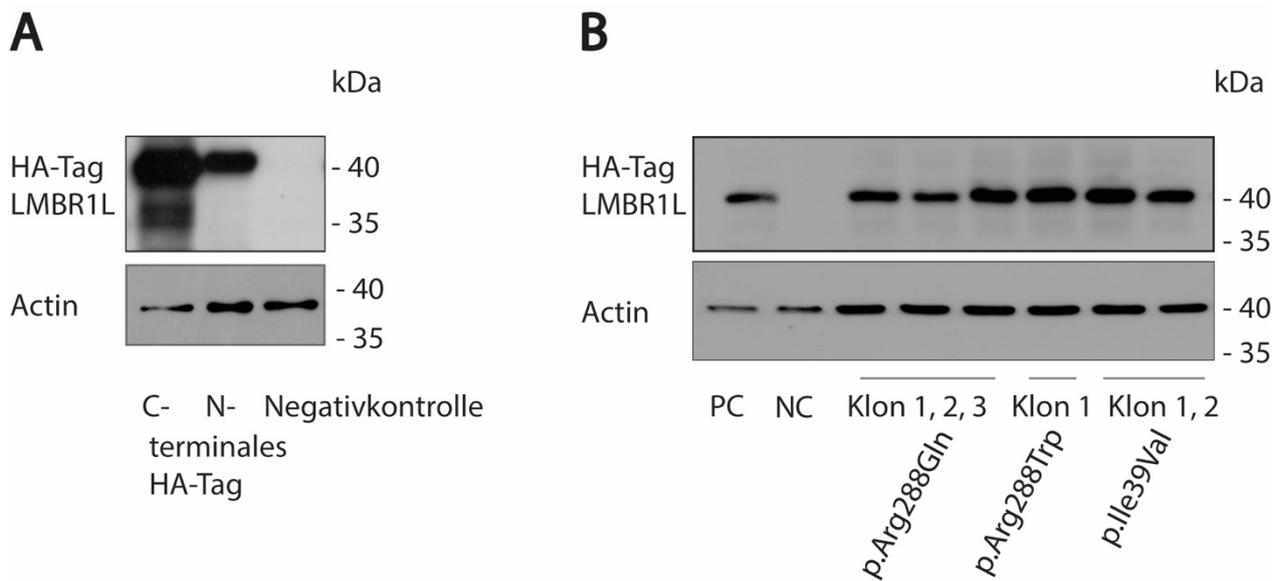


Abb. 12: (A) Klonierter LMBR1L mit C-terminalem wie N-terminalem HA-Tag kann nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen exprimiert werden. Bei circa 40 kDa ist jeweils eine Bande mittels Primärantikörper gegen das HA-Tag darstellbar. Klonierter LMBR1L befindet sich in der Membranproteinfraktion. Als Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK293-Zellen verwendet. (B) Die *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val mit C-terminalem HA-Tag können in HEK293-Zellen exprimiert werden. Als Negativkontrolle (NC) wurden untransfizierte HEK293-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle (PC) dienten HEK293-Zellen, die den LMBR1L mit C-terminalen HA-Tag exprimieren. Actin stellt die Ladungskontrolle dar. Nach Marko et al., 2022

3.10.7.2 Expression von LMBR1L mit HA-Tag in HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen

Für funktionelle Studien des LMBR1L wäre es gut, ein Zellsystem zu haben, worin der endogene LMBR1L definitiv nicht exprimiert ist. Daher entschied ich mich, HAP1-Zellen (haploide Zellen) mit CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) -mediierter Inaktivierung des *LMBR1L* zu verwenden (horizon, UK). Die Plasmid-DNA der *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val und des *LMBR1L*-Wildtyps sowie pcDNA3 Leervektor-Plasmid-DNA mit jeweils C-terminalem HA-Tag wurden transient in HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen transfiziert. Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Membranproteinfraktion. Eine transiente Transfektion der *LMBR1L*-Mutanten in HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen ist möglich, die *LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val können von HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen gebildet werden (Abb. 13). Die drei Mutanten sind in der zellulären Membranproteinfraktion zu finden und zeigen jeweils ein Molekulargewicht von circa 40 kDa (Abb. 13).

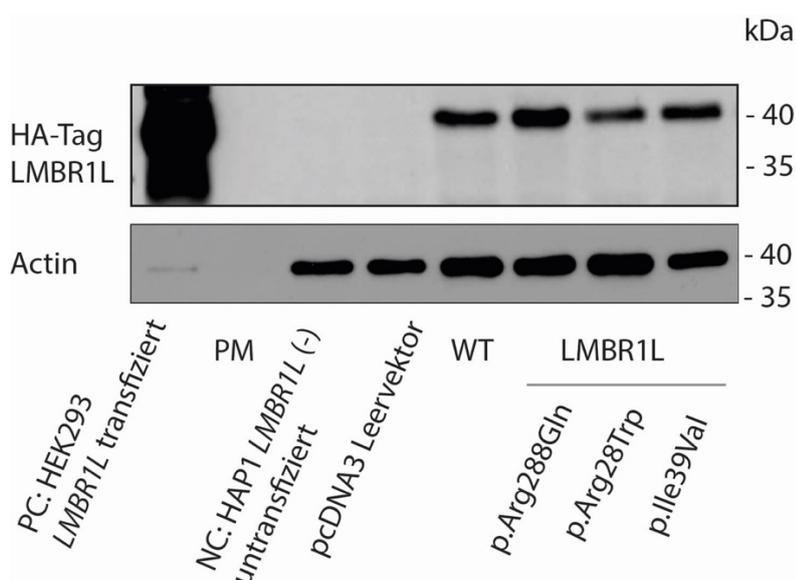


Abb. 13: Die LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val mit C-terminalem HA-Tag können in HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen exprimiert werden. Bei circa 40 kDa ist eine Bande mittels Primärantikörper gegen das HA-Tag darstellbar. Die LMBR1L-Mutanten befinden sich in der Membranproteinfraction, verwendet wurde 20 µg Protein. Als Negativkontrollen (NC) wurden untransfizierte HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen sowie mit pcDNA3 Leervektor transient transfizierte HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle (PC) wurden mit Plasmid-DNA des *LMBR1L*-Wildtyps transient transfizierte HEK293-Zellen (2,5 µg Protein) verwendet. Actin stellt die Ladungskontrolle dar. PM: Proteinmarker. WT: Wildtyp. Nach Marko et al., 2022

3.10.7.3 LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val sind an der Oberfläche von transient transfizierten HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen vermindert nachweisbar

Für Wildtyp und Mutanten des LMBR1L wurden Vorhandensein und Expressionslevel auf der Zelloberfläche durch eine Oberflächenbiotinylierung dargestellt. Verwendet wurde ein Antikörper gegen das HA-Tag (Tab. 28). Im Gesamtlysat ist mittels Western Blot eine vergleichbare Proteinexpression von Wildtyp und Mutanten zu sehen (Abb. 14 A). Zum Vergleich des Expressionsniveaus der Mutanten an der Zelloberfläche wurde in jeder der drei Durchführungen die Expression des LMBR1L-Wildtyps gleich 100 % gesetzt. Das Expressionslevel der einzelnen Mutanten ist bezogen auf die Wildtypexpression angegeben. Verglichen mit dem Niveau der Wildtypexpression ist ein niedrigeres Expressionslevel für jede der drei Mutanten feststellbar (Abb. 14 B). In der Gegenüberstellung der Proteinexpression von Wildtyp und Mutanten zeigt p.Arg288Gln eine signifikante Reduktion von circa 65 % (Abb. 14 C), p.Arg288Trp ist signifikant um circa 75 % vermindert (Abb. 14 D) und p.Ile39Val ist circa 75 % signifikant verringert nachweisbar (Abb. 14 E).

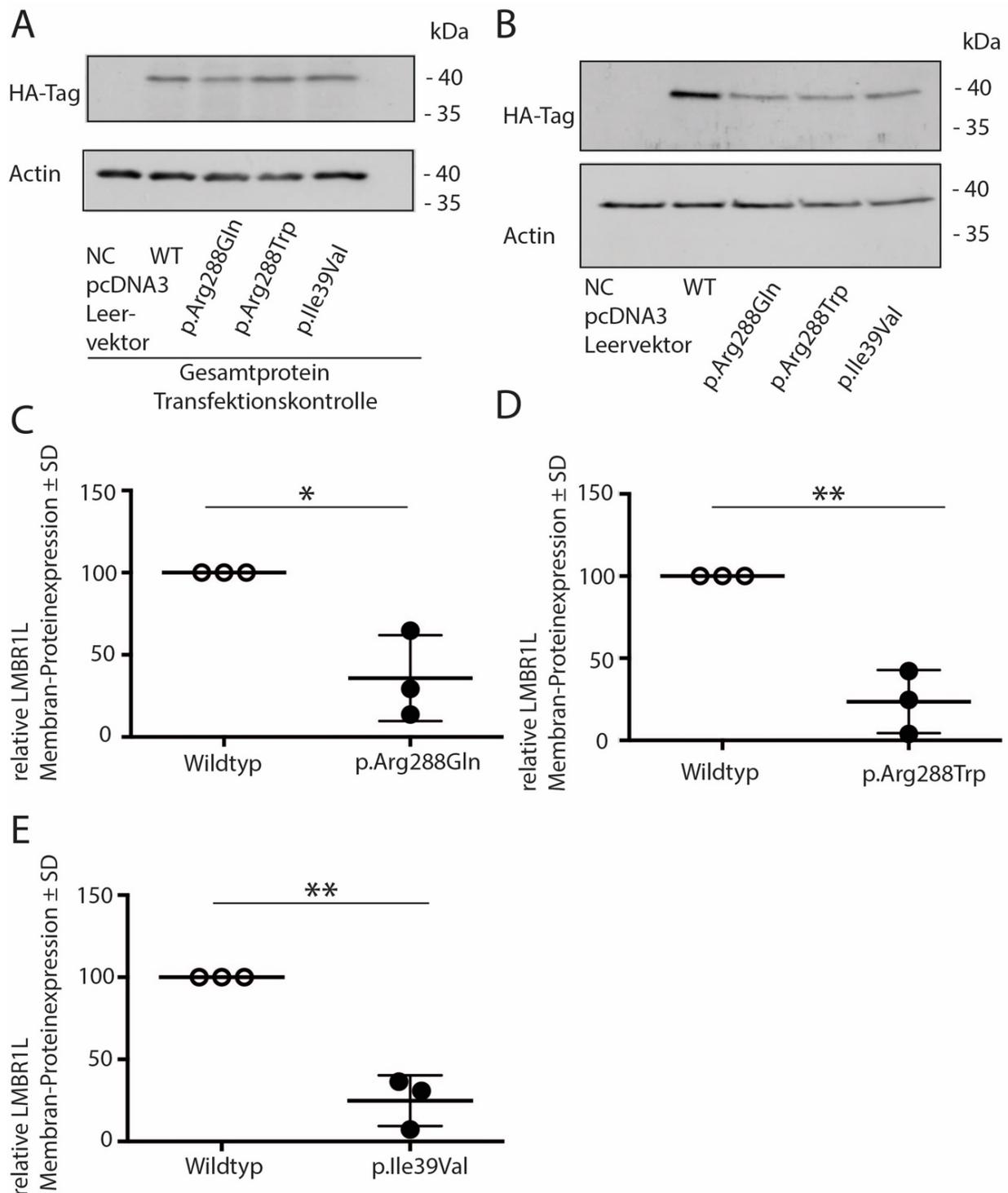


Abb. 14: *LMBR1L*-Mutationen führen zu verminderter *LMBR1L*-Oberflächenexpression. Mit Plasmid-DNA von *LMBR1L*-WT und -Mutanten transient transfizierte HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen wurden auf die *LMBR1L*-Oberflächenexpression untersucht. (A) Vergleich der HA-Tag-*LMBR1L*-Expression: Im Gesamtylat (15 μ L) ist mittels Western Blot eine vergleichbare Proteinexpression von Wildtyp und Mutanten nachweisbar. (B) Die Oberflächenbiotinylierung zeigt die Expression des *LMBR1L*-Wildtyps und der Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val in der Zellmembran, eingesetzt wurde 75 μ L Eluat.

Verwendet wurde ein Antikörper gegen das HA-Tag. Actin stellt die Ladungskontrolle dar. (C - E) Das Expressionslevel der einzelnen Mutanten ist bezogen auf das Expressionsniveau des Wildtyps (entspricht 100 %) dargestellt. (C) Die LMBR1L-Mutante p.Arg288Gln ist im Mittel circa 65 % vermindert in der Zellmembran vorhanden. (D) Die LMBR1L-Mutante Arg288Trp ist um circa 75 % reduziert in der Zellmembran nachweisbar. (E) Die LMBR1L-Mutante p.Ile39Val ist um circa 75 % verringert in der Zellmembran darstellbar. Die Oberflächenbiotinylierung wurde dreimal durchgeführt, verwendet wurden Proben aus drei unabhängigen Transfektionen. Die Daten der Abbildungen C - E stellen die Ergebnisse der drei Durchführungen dar. Abbildung A und B stammen aus einer Durchführung und stellen exemplarisch das Ergebnis dar, das für jede der drei Wiederholungen vorliegt. NC: Negativkontrolle (Transfektion mit pcDNA3 Leervektor). WT: Wildtyp. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, **p* < 0,05, ***p* < 0,01. SD: Standardabweichung. Nach Marko et al., 2022

3.10.7.4 LMBR1L-Proteinexpression ist in Fibroblasten der DSD-Fälle 10 und 11 reduziert
Mit einem Primärantikörper gegen LMBR1L (Tab. 28) wurde der Rezeptor in Genitalhautfibroblasten der DSD-Fälle mit *LMBR1L*-Mutationen (6, 10, 11, Tab. 32) und in Kontrollfibroblasten mittels Western Blot nachgewiesen. Oberhalb des 40 kDa Proteinmarkers ist eine Bande zu sehen, die bei den LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp verringert nachweisbar ist (Abb. 15 A, Abb. 15 C, Abb. 15 D) und aufgrund des Molekulargewichts von circa 40 kDa im Vergleich mit der Größe des klonierten LMBR1L (3.10.7.1) sowie mit Hesselink und Findlay, 2013 LMBR1L zugeordnet wird. Zusätzlich ist eine Bande bei 55 kDa zu sehen, die mit dem erwarteten LMBR1L Molekulargewicht übereinstimmen würde (Wojnar et al., 2001), jedoch nicht der Größe des klonierten LMBR1L (3.10.7.1) (Hesselink und Findlay, 2013) entspricht (Abb. 15 A).

3.10.7.5 LMBR1L ist in der Fibroblastenzellmembran der DSD-Fälle 6, 10 und 11 reduziert
Mittels Oberflächenbiotinylierung wurde die LMBR1L-Oberflächenexpression in Genitalhautfibroblasten der DSD-Fälle mit *LMBR1L*-Mutationen (6, 10, 11, Tab. 32) sowie in Kontrollfibroblasten untersucht. Im Western Blot der Oberflächenbiotinylierung zeigt sich eine etwas oberhalb der 40 kDa Markerbande und somit zur Größe des klonierten LMBR1L (3.10.7.1), (Hesselink und Findlay, 2013) passende Bande. Diese Bande ist bezogen auf Actin in den Fibroblasten der DSD-Fälle 6, 10, 11 im Vergleich mit Kontrollfibroblasten vermindert nachweisbar, sodass in den Genitalhautfibroblasten mit den *LMBR1L*-Mutationen p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val eine Reduktion der LMBR1L-Oberflächenexpression darstellbar ist (Abb. 15 B). Die Bande bei 55 kDa sowie die sich

zwischen 40 kDa und 55 kDa befindende Bande des Western Blots (Abb. 15 A) ist jeweils in der Oberflächenbiotinylierung nicht nachweisbar (Abb. 15 B).

3.10.7.6 Quantifizierung der 40 kDa-Bande der Western Blots

Verglichen mit Kontrollfibroblasten zeigt die etwas oberhalb von 40 kDa liegende Bande des Western Blots (Abb. 15 A), aufgrund der Größe des klonierten LMBR1L (3.10.7.1) (Hesselink und Findlay, 2013) LMBR1L zugeordnet (3.10.7.4), eine signifikante Reduktion um im Mittel circa 75 % bei den Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp (Abb. 15 C, Abb. 15 D). Bei der Mutante p.Ile39Val findet sich keine signifikante Veränderung der Proteinexpression (Abb. 15 E).

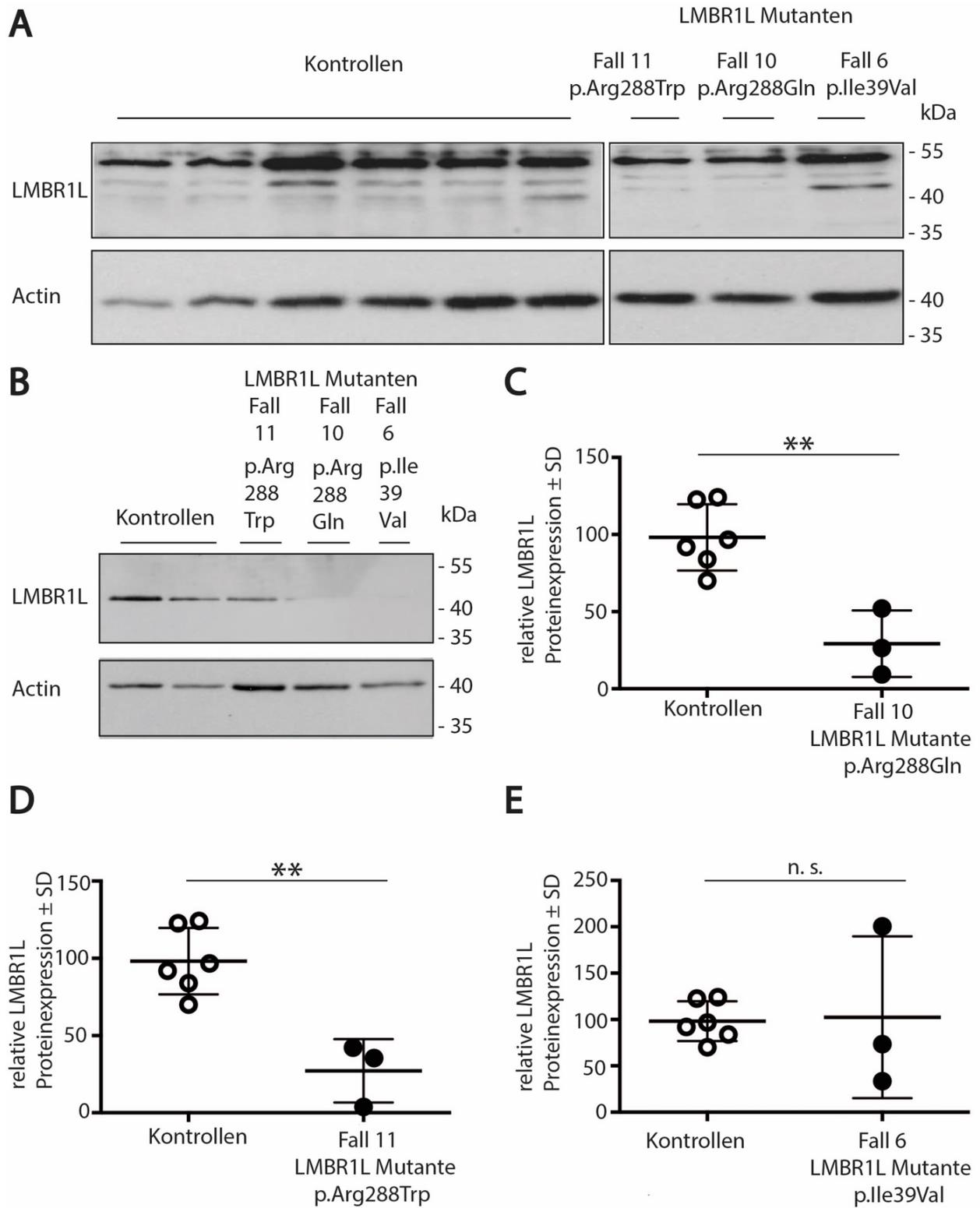


Abb. 15: *LMBR1L*-Mutationen vermindern Protein- und/oder Oberflächenexpression in Fibroblasten von DSD-Individuen. (A) Die *LMBR1L*-Proteinexpression wurde an Genitalhautfibroblasten mittels Antikörper gegen *LMBR1L* untersucht. Der Western Blot zeigt oberhalb von 40 kDa (circa Molekulargewicht klonierter *LMBR1L*, 3.10.7.1, (Hesselink und Findlay, 2013)) sowie bei 55 kDa (nach Wojnar et al., 2001 erwartetes *LMBR1L*-Mo-

lekulargewicht) liegende Banden. Eingesetzt wurde 20 µg Membranprotein. Der Western Blot wurde dreimal durchgeführt, exemplarisch ist ein Experiment abgebildet. Verwendet wurden Proben aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Die LMBR1L-Oberflächenexpression wurde an Genitalhautfibroblasten mittels Antikörper gegen LMBR1L untersucht. Die Oberflächenbiotinylierung zeigt die Expression des LMBR1L-Wildtyps und der Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp, p.Ile39Val in der Zellmembran, eingesetzt wurde 90 µL Eluat. Die drei LMBR1L-Mutanten (circa 40 kDa) sind im Vergleich zu Kontrollzelllinien vermindert in der Plasmamembran vorhanden. Die Oberflächenbiotinylierung an Genitalhautfibroblasten wurde einmal durchgeführt. Eine Quantifizierung dieser Oberflächenbiotinylierung erfolgte nicht, da optisch im Vergleich mit Actin eine Reduktion der 40 kDa/LMBR1L-Banden in den Fibroblasten der Fälle 6, 10, 11 verglichen mit den Fibroblasten der Kontrollen erkennbar ist. (C - E) Quantifizierung der 40 kDa/LMBR1L-Bande der Western Blots. (C+D) LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp zeigen eine verringerte Proteinexpression um im Mittel circa 75 %. (E) LMBR1L-Mutante p.Ile39Val zeigt keine signifikant veränderte Proteinexpression. Actin stellt die Ladungskontrolle dar. Die statistische Auswertung erfolgte mittels *t*-Test, ** $p < 0,01$. SD: Standardabweichung. n. s.: nicht signifikant.

4. Diskussion

Ziel meiner Arbeit war es, bei Individuen mit ungeklärten DSD (1.8) anhand genetischer Untersuchungen Genmutationen (4.12) zu finden, die den vorliegenden DSD-Phänotyp erklären können sowie möglicherweise neue Gene zu identifizieren, die DSD zugrunde liegen könnten. Dazu wurden die DSD-Fälle aufgrund der biochemischen (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) und klinischen (1.8, anonymisierte Einsendung) Charakterisierungen so ausgewählt, dass klassische Gene wie *AR* und *5 α -Reduktase 2* möglichst ausgeschlossen waren. Zum Vergleich wurden jedoch auch zwei Fälle bearbeitet, die wie klassische DSD-/ CAIS-Fälle aussahen. Im Diskussionsteil dargestellte Überlegungen finden sich anteilig auch in der Publikation „Genomic variants reducing expression of two endocytic receptors in 46,XY differences of sex development“, Marko et al., Human Mutation, 2022. Die Publikation wurde anhand dieser Dissertationsschrift verfasst, die Autorin der Dissertationsschrift ist die Erstautorin der genannten Publikation. Es wird im nachfolgenden Text auf eine Zitierung verzichtet.

4.1 Der CAIS bei Fall 1 liegt eine *AR*-Mutation in der LBD (p.Arg856Cys) zugrunde
 Bei Fall 1 ist die Mutation p.Arg856Cys (3.2, Abb. 1 A, Tab. 32) in der Ligandenbindungsdomäne des Androgenrezeptors lokalisiert (Achermann und Hughes, 2011), mittels vorliegender Daten zur biochemischen Charakterisierung der Genitalhautfibroblasten (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) war keine Bindung von DHT an den Androgenrezeptor nachweisbar (3.2, Tab. 33). Eine beeinträchtigte Ligandenbindung stört die androgenabhängige Genexpression und hierdurch regulierte Entwicklungsprozesse, was sich als vermindertes oder fehlendes Ansprechen des Zielgewebes auf Androgenstimulation äußert (Achermann und Hughes, 2011). Dies ist anhand der Phänotypbeschreibung (3.2, Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung) von Fall 1 zu erkennen: Ein genetisch männliches Individuum erscheint als phänotypisch weiblich (Achermann und Hughes, 2011). Der in Fall 1 vorhandene Hinweis auf das Vorliegen einer Androgenresistenz ist eine beeinträchtigte Pubertätsentwicklung (3.2), das Pubertätsalter stellt einen typischen Diagnosezeitpunkt der CAIS dar, da Betroffene durch eine primäre Amenorrhoe auffallen können (Achermann und Hughes, 2011). Die bei Fall 1 gefundene Mutation des Androgen-

rezeptors p.Arg856Cys (3.2, Abb. 1 A, Tab. 32) wurde bereits beschrieben (Hiort et al., 1996 und Yuan et al., 2018) und ist in der Datenbank für *AR*-Mutationen (Gottlieb B et al., The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server, The Lady Davis Institute for Medical Research, Tab. 3) zu finden. Die Analyse der *AR*-Mutation p.Arg856Cys mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) führt zu einer Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 35). Auch in ClinVar (Tab. 3) findet sich die Einordnung der *AR*-Mutation p.Arg856Cys als pathogen (3.2). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Cystein tauscht eine Aminosäure mit basischer Seitenkette (Arginin) gegen eine Aminosäure mit ungeladener Seitenkette (Cystein) aus, sodass aufgrund des Ersatzes von Arginin durch Cystein die Ladung einer Aminosäureseitenkette fehlt. Bei Fall 1 ist in den vorhandenen biochemischen Daten (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) keine Enzymaktivität der 5 α -Reduktase 2 nachweisbar gewesen (3.2, Tab. 33). Diese beeinträchtigte Enzymaktivität bei gleichzeitigem Vorliegen einer Androgenrezeptormutation könnte auf eine sekundäre 5 α -Reduktase 2-Defizienz zurückzuführen sein (Boehmer et al., 2001 und Imperato-McGinley et al., 1982).

4.2 Der CAIS bei Fall 2 liegt eine *AR*-Mutation in der DBD (p.Arg616His) zugrunde
 Bei Fall 2 ist die Mutation p.Arg616His (3.3, Abb. 1 B, Tab. 32) in der DNA-Bindungsdomäne des Androgenrezeptors lokalisiert und sollte somit die DNA-Bindungs­kapazität des Androgenrezeptors beeinträchtigen (Achermann und Hughes, 2011). Durch vermindertes Ansprechen des Zielgewebes auf Androgenstimulation werden hormonell gesteuerte Entwicklungsprozesse und Phänotypbildung gestört (Achermann und Hughes, 2011). Dieser Effekt ist anhand der Phänotypbeschreibung (3.3, Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung) von Fall 2 zu erkennen: Ein genetisch männliches Kind erscheint phänotypisch als weiblich (Achermann und Hughes, 2011). Fall 2 zeigt, dass inguinale Hernien bei einem phänotypisch weiblichen Kind (3.3, Tab. 34) auf eine Androgenresistenz hinweisen können (Audi et al., 2010). Bei CAIS werden Hernien durch in der Leiste liegende Hoden verursacht (Hughes et al., 2012). Dies stellt eine weitere Auffälligkeit dar, die bei bisher als weiblich aufgewachsenen Individuen einen Anlass zur DSD-Diagnostik gibt (Audi et al., 2010). Die bei Fall 2 nachgewiesene Androgen-

rezeptormutation p.Arg616His (3.3, Abb. 1 B, Tab. 32) wurde bereits beschrieben (Ferlin et al., 2006 und Hannema et al., 2004 und Hiort et al., 1996) und ist in der Datenbank für AR-Mutationen (Gottlieb B et al., The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server, The Lady Davis Institute for Medical Research, Tab. 3) zu finden sowie in der AR-Mutations-Übersicht von Gottlieb et al., 2012 enthalten. Die Analyse der AR-Mutation p.Arg616His mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, Mutation-Assessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) führt zu einer Einstufung als pathogene Mutation (Tab. 35). Auch in ClinVar (Tab. 3) findet sich die Einordnung der AR-Mutation p.Arg616His als pathogen (3.3). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Histidin tauscht zwei Aminosäuren mit jeweils basischer Seitenkette aus, verglichen mit der Seitenkette des Arginins ist die Seitenkette des Histidins verkürzt und enthält zudem einen Imidazolring. Das basale Testosteron (Tab. 34) liegt für Fall 2 innerhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs für männliche Kinder (Konforte et al., 2013), der hCG-stimulierte Testosteronwert (Tab. 34) zeigt eine normale Stimulierbarkeit der Testosteronsekretion an (Bidlingmaier, 2019 b) (1.8, anonymisierte Einsendung). Bei intakter basaler Testosteronsynthese und Stimulierbarkeit der Testosteronsekretion durch hCG weist der Phänotyp von Fall 2 (3.3, Tab. 34) auf ein vermindertes Ansprechen auf das normal vorhandene Testosteron hin (Hughes et al., 2012). Diese Kombination von normalen Testosteronwerten und reduzierter männlicher Phänotypentwicklung ist für Androgeninsensitivitätssyndrome beschrieben, denen Mutationen im Androgenrezeptorgen zugrunde liegen (Hughes et al., 2012). Eine solche Androgenrezeptormutation wurde für Fall 2 mit p.Arg616His (3.3, Abb. 1 B, Tab. 32) nachgewiesen.

4.3 Diskussion der Ergebnisse des APOD Assay für Fall 1 und 2

Fall 1 und Fall 2 zeigen anhand der jeweiligen Phänotypbeschreibung und klinischem Verlauf (3.2, 3.3, Tab. 34) die essentielle Bedeutung des Androgenrezeptors für die Regulation männlicher Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse (Achermann und Hughes, 2011). Das APOD Assay (Hornig et al., 2016) zeigt für Fall 1 und Fall 2 Ergebnisse unterhalb des jeweiligen Cut-offs (Tab. 33) und weist somit auf eine AIS hin (Hornig et al., 2016). Die nachgewiesenen Androgenrezeptormutationen (3.2, 3.3, Tab. 34) zeigen zumindest für diese beiden Fälle, dass das APOD Assay auf Mutationen des

AR, sowohl in der LBD wie auch in der DBD, hinweisen kann (Hornig et al., 2016). Die molekulargenetische Klärung beider Fälle anhand von Exomsequenzierung illustriert jedoch die inzwischen einfachere definitive Diagnosestellung (Ahmed et al., 2013 und Eggers et al., 2016) bei CAIS-Phänotyp und zugrunde liegender *AR*-Mutation, insbesondere, wenn die nachgewiesenen *AR*-Mutationen bereits bekannt (Gottlieb B et al., The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server, The Lady Davis Institute for Medical Research, Tab. 3) sind.

4.4 Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 3 liegt eine *MAP3K1*-Mutation (p.Arg339Gln) zugrunde

4.4.1 Physiologische Funktion und mutationsbedingte Funktionsänderung von *MAP3K1*
MAP3K1 ist eine Serin-Threonin-Kinase (Ray und Sturgill, 1988 und Pearson et al., 2001), die in Entwicklungsprozessen extrazelluläre Signale zur Regulation zellulärer Vorgänge integriert (Craig et al., 2008). Ein Regulator der *MAP3K1*-Aktivität ist RHOA (Ras homolog family member A) (Gallagher et al., 2004), die Bindung von *MAP3K1* an RHOA kann durch *MAP3K1*-Mutationen beeinflusst werden (Loke et al., 2014). Zudem können *MAP3K1*-Mutationen die Phosphorylierung nachgeschalteter Proteine wie p38 (p38 mitogen-activated protein kinase) und ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase) verändern, woraus eine abweichende Signalkaskade folgt (Loke et al., 2014).

4.4.2 *MAP3K1* als DSD-Gen

Die Assoziation von DSD und dem Genlocus für *MAP3K1* erfolgte anhand mehrerer DSD-Fälle in einer Familie (Jawaheer et al., 2003). Auch weitere Fallbeschreibungen von *MAP3K1*-Mutationen zeigen ein familiär gehäuftes Vorkommen (Granados et al., 2017). Mutationen im *MAP3K1*-Gen werden autosomal-dominant vererbt (Jawaheer et al., 2003). Die Charakterisierung von - bei DSD-Individuen gefundenen - *MAP3K1*-Mutationen im Zellmodell zeigt veränderte Aktivitäten der *MAP3K1* nachgeschalteten Signalmoleküle (Loke et al., 2014). Die mutationsbedingt veränderte Interaktion von *MAP3K1* mit RHOA führt zu reduzierter Expression des Transkriptionsfaktors SOX9 (SRY related high mobility group box 9) (Loke et al., 2014), der die Entwicklung und Differenzierung der Hoden reguliert (Qin und Bishop, 2005). Gesteigerte Phosphorylierung von p38 und ERK1/2 führt

zur vermehrten Expression sowie zu gesteigerter Aktivität von β -Catenin (Loke et al., 2014). Beta-Catenin ist ein Faktor der Ovariendifferenzierung (Eggers und Sinclair, 2012). Bei genetisch männlichem Karyotyp führt die Reduktion eines Regulators der Hodendifferenzierung (SOX9) bei zusätzlich dazu erhöht vorliegendem, vermehrt aktiven Faktor der Ovarienausbildung (β -Catenin) zu atypischen testikulären Entwicklungsabläufen und beeinträchtigter Genitalorgandifferenzierung (Loke et al., 2014 und Maatouk et al., 2008).

4.4.3 Phänotypische Ausprägung von *MAP3K1*-Mutationen aus Fallbeschreibungen

MAP3K1-Mutationen können beim männlichen Karyotyp 46,XY einem in männliche Richtung entwickelten Phänotyp mit genitalen Auffälligkeiten wie Hypospadie, Micropenis, Scrotum bifidum zugrunde liegen (Granados et al., 2017 und Jawaheer et al., 2003). Für die inneren Genitalorgane ist das gleichzeitige Vorliegen von Derivaten der Wolff-Gänge und der Müller-Gänge möglich (Granados et al., 2017).

4.4.4 Bei Fall 3 zeigen Anamnese und Phänotyp Charakteristika einer *MAP3K1*-Mutation

Für Fall 3 sind Phänotyp und Genitalorgane als intergeschlechtlich und sowohl mit Aspekten einer männlichen als auch mit Aspekten einer weiblichen Entwicklungsrichtung beschrieben (3.4, Tab. 34). Bei Fall 3 liegt die *MAP3K1*-Mutation p.Arg339Gln vor (3.4, Abb. 2 A, Tab. 32). Die Analyse der *MAP3K1*-Mutation p.Arg339Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 36). In ClinVar (Tab. 3) findet sich die Einstufung der *MAP3K1*-Mutation p.Arg339Gln als wahrscheinlich pathogen (3.4). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Glutamin tauscht eine Aminosäure mit basischer Seitenkette (Arginin) gegen eine Aminosäure mit ungeladener Seitenkette (Glutamin) aus, sodass aufgrund dieses Ersatzes von Arginin durch Glutamin die Ladung einer Aminosäureseitenkette fehlt. *MAP3K1*-Mutationen ändern die Abläufe der *MAP3K1* nachgeschalteten Signalwege, wodurch Faktoren der männlichen Entwicklungsrichtung (SOX9) vermindert und die der weiblichen Entwicklungsrichtung (β -Catenin) erhöht vorliegen (Loke et al., 2014 und Maatouk et al., 2008). Der für Fall 3 beschriebene Phänotyp (3.4, Tab. 34) passt zu den dargestellten molekularen Vorgängen

bei *MAP3K1*-Mutation, ein mögliches Vorhandensein von Faktoren der weiblichen wie männlichen Geschlechtsentwicklung (Loke et al., 2014 und Maatouk et al., 2008) wäre bei Fall 3 mit der beschriebenen ambivalenten Differenzierung von Geschlechtsorganen und Phänotyp (3.4, Tab. 34), (Granados et al., 2017) nachzuvollziehen. Bei Fall 3 vorliegende phänotypische Auffälligkeiten wie Hypospadie, labienähnliches Scrotum bifidum und Micropenis (3.4, Tab. 34) sind mit weiteren *MAP3K1*-DSD Fallbeschreibungen (Granados et al., 2017 und Jawaheer et al., 2003) vergleichbar. Zusätzlich liegen neben männlichen inneren Genitalorganen Strukturen der weiblichen inneren Genitalorgane vor (3.4), was einen ebenfalls bei *MAP3K1*-Mutationen beschriebenen Befund darstellt (Granados et al., 2017 und Jawaheer et al., 2003). Auch ist bei einem Bruder des DSD-Falls 3 ein DSD-Phänotyp beschrieben (3.4), eine familiäre Häufung von *MAP3K1*-Mutationen ist in weiteren Fallbeschreibungen zu finden (Granados et al., 2017 und Jawaheer et al., 2003).

4.5 Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 4 liegt eine *WWOX*-Mutation (p.Thr339Ser) zugrunde

4.5.1 Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens *WWOX*

WWOX (WW domain-containing oxidoreductase) -Expression ist in hormonell aktiven Organen und Geweben nachweisbar, am stärksten ist *WWOX* in Hoden, Prostata und Ovarien exprimiert (Bednarek et al., 2000). *WWOX* enthält zwei charakteristische Domänen (Bednarek et al., 2000). Mittels N-terminaler WW-Domänen (WW: zweimal Tryptophan) zur Protein-Protein-Interaktionen soll *WWOX* die Regulation der Steroidrezeptoraktivität beeinflussen können (Bednarek et al., 2000). Die SRD (short-chain dehydrogenase/reductase) -Domäne befindet sich zentral im Protein und stellt eine Bindestelle für Liganden und Cofaktoren dar (Bednarek et al., 2000). Aufgrund des Expressionsmusters sowie der SRD-Domäne wird für die *WWOX*-Dehydrogenase-/ Reduktaseaktivität ein Steroid als Substrat vermutet und eine Funktion im Steroidmetabolismus angenommen (Bednarek et al., 2000). Eine Charakterisierung der molekularen Funktion von *WWOX* in Hefe- und Zellmodellen zeigt, dass (transfiziertes) *WWOX* mit Signalmolekülen des Wnt (Wingless-related integration site) / β -Catenin-Wegs interagiert und diesen Signalweg negativ beeinflusst, sodass hierbei reduzierte *WWOX*-Effekte zu einer

erhöhten Aktivität der Wnt/ β -Catenin Kaskade führen (Boutelle et al., 2009). Der WNT/ β -Catenin Signalweg ist ein physiologischer Bestandteil der Ovarienentwicklung (Eggers und Sinclair, 2012).

4.5.2 *Wwox*-Mausmodelle

Zur Klärung einer möglichen Rolle von *WWOX/Wwox* bei der DSD-Entstehung können Mausmodelle mit *Wwox*-Mutation oder -Knockout herangezogen werden. *Wwox*-Knockout-Mäuse fallen bei Geburt durch eine atypische Gonadenentwicklung auf, die testikulären Leydig-Zellen sind fehlerhaft entwickelt und im Entwicklungsverlauf reduziert sich die Zellzahl des Hodens (Aqeilan et al., 2009). Zusätzlich beeinträchtigt ein *Wwox*-Knockout die Steroidhormonbiosynthese, eine verringerte Expression der testosteronsynthetisierenden Enzyme Steroid-17 α -Hydroxylase (*Cyp17a1*), 20,22-Desmolase (*Cyp11a1*), 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 6 (*Hsd3b6*) führt bei männlichen *Wwox*-Knockout-Mäusen zu nicht messbarem Testosteron (Aqeilan et al., 2009). Zudem zeigt die Hypophyse eine *Wwox*-Expression (Aqeilan et al., 2007), in *Wwox*-Knockout-Mäusen sind die hypophysären Hormone FSH und LH vermindert nachweisbar (Aqeilan et al., 2009).

4.5.3 Fall 4 stellt einen der wenigen 46,XY DSD-Fälle mit *WWOX*-Mutation dar

Mutationen im Gen *WWOX* sind bislang bei wenigen DSD-Fällen gefunden worden, bei Fall 4 ist wie auch bei einem Teil der *WWOX*-Fallbeschreibungen von White et al., 2012 und Kim et al., 2017 die *WWOX*-Mutation heterozygot nachweisbar (3.5, Abb. 2 B, Tab. 32). Die Analyse der *WWOX*-Mutation p.Thr339Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 37). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Threonin gegen Serin tauscht zwei Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten aus. Die Seitenkette des Threonins enthält eine zusätzliche Methylgruppe, deren Fehlen keine schwerwiegenden Auswirkungen auf Proteinstruktur und/oder -funktion annehmen lässt. Je nach Funktion des Threonins 339 in *WWOX* ist jedoch eine *in vivo* Auswirkung von p.Thr339Ser möglich. Vergleichbar mit vorliegenden Fallbeschreibungen sind bei Fall 4

genitale Auffälligkeiten wie Hypospadien (3.5, Tab. 34) (Kim et al., 2017). Eine mögliche WWOX-Funktion im Hypophysen-Gonaden-(Hormon-) System (Bednarek et al., 2000 und White et al., 2012) könnte bei WWOX-Mutationen beeinträchtigt sein und einer atypischen Geschlechtsentwicklung zugrunde liegen (White et al., 2012). Bei Fall 4 beschriebene Gleithoden (3.5, Tab. 34) stellen eine Form des Maldescensus testis (Stein und Thüroff, 2014) dar. Für einen Maldescensus testis wird ursächlich ein beeinträchtigter Hormonstoffwechsel angenommen (Sadler, 2014). Der bei Fall 4 vorliegende Gleithoden (3.5, Tab. 34) könnte somit auf eine Beeinträchtigung im Hormonsystem durch WWOX-Mutationen hinweisen und eine Funktion von WWOX im Steroidhormonsystem (Bednarek et al., 2000 und White et al., 2012) stützen.

4.6 Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 5 liegen Mutationen in *MAMLD1* (p.Arg7Gln) und/oder *MAP3K1* (p.Thr125Ser) zugrunde

4.6.1 Physiologische Funktion des Gens *MAMLD1*

MAMLD1 (Mastermind-like Domain-containing 1) enthält eine Zielsequenz des SF1 (steroidogenic factor 1) (Fukami et al., 2008), einem Transkriptionsregulator der Geschlechtsentwicklung (Morohashi und Omura, 1996).

4.6.2 *Mamld1*-Knockout Mausmodell

Bei Mäusen wird im Zeitraum der fetalen Geschlechtsorganentwicklung *Mamld1* in Sertoli- und Leydig-Zellen exprimiert (Fukami et al., 2006). Hieraus entstand die Hypothese, dass bei Individuen mit *MAMLD1*-Mutation eine beeinträchtigte Leydig-Zell-Funktion mit Störung der Testosteronsynthese während der fetalen Genitalorgandifferenzierung zur fehlerhaften Geschlechtsorganentwicklung führt (Fukami et al., 2006). Für Leydig-Zellen charakteristische Gene des Steroidhormonstoffwechsels wie *Star* (Steroidogenic acute regulatory protein), *Cyp11a1* (20,22-Desmolase), *Cyp17a1* (Steroid-17 α -Hydroxylase), *Hsd3b1* (3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 1) werden in Hoden von *Mamld1*-Knockout-Mäusen vermindert exprimiert (Miyado et al., 2012). Es zeigt sich jedoch kein DSD-ähnlicher Phänotyp bei diesen *Mamld1*-Knockout-Mäusen, was mit Unterschieden der Geschlechtsentwicklung zwischen Mäusen und Menschen begründet wird (Miyado et al., 2012).

4.6.3 *MAMLD1*-Mutationen als Ursache für DSD beim Menschen

Der chromosomale Abschnitt Xq28, auf dem sich das *MAMLD1*-Gen befindet, wurde anhand von männlichen Jugendlichen mit myotubulärer Myopathie und atypisch entwickelten Genitalorganen charakterisiert (Hu et al., 1996 und Laporte et al., 1997). Eine Expression von *MAMLD1* ist beim Menschen sowohl in fetalen als auch in adulten Hoden nachweisbar (Camats et al., 2015 und O'Shaughnessy et al., 2007). Phänotypische Beschreibungen bei *MAMLD1*-Mutationen umfassen Hypospadien (Fukami et al., 2006), Micropenis und Scrotum bifidum (Kalfa et al., 2012) sowie reduzierte Hodenvolumina (Fujisawa et al., 2016) und atypische Hodenlokalisationen (Camats et al., 2015). Es wird angenommen, dass sich *MAMLD1*-Mutationen altersabhängig auf die Gonadenfunktion auswirken, Langzeitbeobachtungen von Individuen mit *MAMLD1*-Mutationen zeigen, dass im Laufe der Entwicklung hypogonadotrope Testosteronwerte auftreten können (Fujisawa et al., 2016).

4.6.4 Bei Fall 5 ist eine oligogene DSD-Entstehung möglich

Bei Fall 5 liegt die *MAMLD1*-Mutation p.Arg7Gln vor (3.6, Abb. 3 A, Tab. 32). Die Analyse der *MAMLD1*-Mutation p.Arg7Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 38). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Glutamin tauscht eine Aminosäure mit basischer Seitenkette (Arginin) gegen eine Aminosäure mit ungeladener Seitenkette (Glutamin) aus. Die mögliche Pathogenität der Mutation p.Arg7Gln kann der nun beim Glutamin fehlenden Ladung der Aminosäureseitenkette zugrunde liegen, da die Ladung des Arginins eine Funktion für die Struktur und/oder Funktion des Proteins *MAMLD1* haben könnte. Fall 5 zeigt mit einer Hypospadie (3.6, Tab. 34) das charakteristische phänotypische Merkmal bei *MAMLD1*-Mutationen (Fukami et al., 2006 und Li et al., 2020 und Miyado et al., 2021) sowie weitere Auffälligkeiten der externen Genitalorgane (3.6, Tab. 34). Für die Entstehung von Hypospadien wird eine Dysfunktion des Hodens mit reduzierter Hormonsynthese während der Geschlechtsorganentwicklung angenommen (Ogata et al., 2009). Durch Beobachtungen stark variierender Phänotypen bei *MAMLD1*-Mutationen gibt es die Hypothese, dass *MAMLD1*-

Mutationen teilweise einer oligogenen DSD-Entstehung zugrunde liegen könnten (Camats et al., 2015 und Camats et al., 2020 und Kouri et al., 2021 und Miyado et al., 2021). Durch die Sequenzierung des Exoms wurde bei Fall 5 eine Mutation (p.Thr125Ser) in einem weiteren DSD-assoziierten Gen, *MAP3K1* (Jawaheer et al., 2003), nachgewiesen (3.6, Abb. 3 B, Tab. 32). Die Analyse der *MAP3K1*-Mutation p.Thr125Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ordnet diese als apathogen ein (Tab. 38). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Threonin gegen Serin tauscht zwei Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten aus. Die Seitenkette des Threonins enthält eine zusätzliche Methylgruppe, deren Fehlen keine schwerwiegenden Auswirkungen auf Proteinstruktur und/oder -funktion annehmen lässt. Je nach Funktion des Threonins 125 ist eine mögliche strukturelle oder funktionelle Beeinflussung von *MAP3K1* durch die Mutation p.Thr125Ser jedoch möglich. Mittels klinisch-phänotypischer Charakteristiken kann bei DSD nicht verlässlich auf die zugrunde liegende Genmutation geschlossen werden (Ahmed et al., 2013 und Kolesinska et al., 2018), somit kann derzeit nicht entschieden werden, ob für den bei Fall 5 beobachteten DSD-Phänotyp eher die *MAMLD1*- oder die *MAP3K1*-Mutation ausschlaggebend (Kouri et al., 2021) ist. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Mutationsanalysetools (Tab. 38) könnte bei Fall 5 die *MAMLD1*-Mutation für die Ausprägung von DSD als bedeutsamer angenommen werden. Mit Fall 5 kann durch den Nachweis von zwei Genmutationen in den DSD-assoziierten Genen *MAMLD1* und *MAP3K1* jedoch auch ein solcher DSD-Fall vorliegen, dem eine oligogene DSD-Entstehung bei *MAMLD1*-Mutation (Camats et al., 2015 und Camats et al., 2020 und Kouri et al., 2021 und Miyado et al., 2021) zugrunde liegt.

4.6.5 Diskussion der Testosteronwerte für Fall 5

Das basale Testosteron (Tab. 34, anonymisierte Einsendung) liegt für Fall 5 innerhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs für männliche Kinder (Konforte et al., 2013), zudem zeigt der hCG-stimulierte Testosteronwert (Tab. 34, anonymisierte Einsendung) eine normale Stimulierbarkeit der Testosteronsekretion an (Bidlingmaier, 2019 b). Für *MAMLD1*-Mutationen ist beschrieben, dass im Entwicklungsverlauf Auffälligkeiten des Hypophysen-Gonaden-Hormonsystems auftreten können (Fujisawa et al., 2016). Bei in-

takter basaler Testosteronsynthese und Stimulierbarkeit der Testosteronsekretion durch hCG weist der Phänotyp von Fall 5 (3.6) auf ein vermindertes Ansprechen auf das normal vorhandene Testosteron hin (Hughes et al., 2012). Diese Kombination von normalen Testosteronwerten und reduzierter männlicher Phänotypentwicklung ist für Androgeninsensitivitätssyndrome beschrieben, denen *AR*-Mutationen zugrunde liegen (Hughes et al., 2012). Fall 5 zeigt jedoch keine Mutation im *AR*. Der einem Androgeninsensitivitätssyndrom ähnelnde Phänotyp von Fall 5 wird somit am wahrscheinlichsten durch die nachgewiesenen *MAMLD1*- und/oder *MAP3K1*-Mutationen (3.6, Abb. 3, Tab. 32) verursacht, für beide Gene ist eine Assoziation mit DSD-Phänotypen beschrieben (Camats et al., 2015 und Fujisawa et al., 2016 und Fukami et al., 2006 und Granados et al., 2017 und Jawaheer et al., 2003 und Kalfa et al., 2012 und Miyado et al., 2021).

4.6.6 Diskussion des Ergebnisses des APOD Assay für Fall 5

Das APOD Assay (Hornig et al., 2016) zeigt für Fall 5 Ergebnisse unterhalb des Cut-offs (Tab. 33), (Hornig et al., 2016). Bei Fall 5 liegt keine *AR*-Mutation vor. Möglicherweise wirken sich die bei Fall 5 nachgewiesenen Mutationen in *MAMLD1* und *MAP3K1* (3.6, Abb. 3, Tab. 32) auf das APOD Assay aus, sodass eine indirekte Beeinträchtigung der Genexpression der nachgewiesenen reduzierten *APOD*-Induktion (Tab. 33, Hornig et al., 2016) zugrunde liegen könnte.

4.7 Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 6 liegen Mutationen in *HSD17B3* (p.0?) und *ZFPM2* (p.His320Arg) zugrunde

4.7.1 Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens *HSD17B3*

In Leydig-Zellen synthetisiert das Enzym HSD17B3 (17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase 3) Testosteron aus Androstendion (Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie). Im Verlauf der Entwicklung wirkt Testosteron auf die Ausbildung der männlichen Geschlechtsorgane (Achermann und Hughes, 2011). *HSD17B3*-Mutationen können sich auf die Testosteronsynthese auswirken und somit testosteronabhängige Differenzierungsprozesse beeinträchtigen (Andersson et al., 1996). *HSD17B3*-Mutationen stellen eine autosomal-rezessive Ursache für DSD bei männlichem Karyotyp 46,XY dar (Boehmer et al., 1999).

4.7.2 Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens *ZFPM2*

ZFPM2 (Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2) ist als Cofaktor des Transkriptionsregulators GATA4 (Bindungsfähigkeit für die DNA-Sequenz „GATA“) an Transkriptionsvorgängen von Geschlechtsdetermination und -differenzierung beteiligt (Bashamboo et al., 2014 und Manuylov et al., 2007 und Tevosian et al., 2002).

4.7.3 *Zfpm2*-Knockout im Mausmodell

In Mäusen wird *Zfpm2* in Herz, Gehirn und Gonaden exprimiert (Lu et al., 1999). *Zfpm2* interagiert mit Gata-Faktoren zur Regulation Gata-abhängiger Genexpressionsvorgänge (Lu et al., 1999). Hierbei wirkt *Zfpm2* gewebeabhängig als Coaktivator oder Corepressor der Gentranskription (Lu et al., 1999). Histologisch zeigen *Zfpm2*-Knockout-Mäuse atypisch ausgebildetes Hodengewebe als Zeichen beeinträchtigter testikulärer Differenzierung (Tevosian et al., 2002). Dies ist auf eine reduzierte Expression von *Sry* zurückzuführen, da diese durch *Gata4/Zfpm2* vermittelt wird (Tevosian et al., 2002). Zusätzlich ist die Entwicklung der Leydig-Zellen sowie die Expression von Enzymen der Steroidhormonbiosynthese bei *Zfpm2*-Knockout-Mäusen beeinträchtigt (Tevosian et al., 2002).

4.7.4 Pathophysiologie der *ZFPM2*-Mutationen von DSD-Individuen

Im Zellmodell zeigt der Vergleich von Wildtyp-*ZFPM2* und *ZFPM2* mit Mutationen von DSD-Individuen, dass *ZFPM2*-Mutanten die Interaktion mit GATA4 beeinflussen und somit die Gonaden-/ Geschlechtsentwicklung beeinträchtigt ist (Bashamboo et al., 2014). Bei den Betroffenen ist eine atypische Entwicklung der Genitalorgane und eine Beeinträchtigung der Hodenentwicklung mit histologisch nachweisbarem atypischen Hodengewebe beschrieben (Bashamboo et al., 2014). *ZFPM2*-Mutationen können sich durch dominante Ausprägung heterozygot im Phänotyp auswirken (Bashamboo et al., 2014).

4.7.5 Bei Fall 6 finden sich in zwei DSD-assoziierten Genen Mutationen

Fall 6 zeigt mit Genmutationen in *HSD17B3* und *ZFPM2* (3.7, Tab. 32) Mutationen in zwei Genen, die mit der Ausbildung von DSD im Zusammenhang stehen (Andersson et al., 1996 und Bashamboo et al., 2014 und Boehmer et al., 1999). Die erste Mutation im Gen *HSD17B3*, p.0? (3.7, Abb. 4 A, Tab. 32), betrifft das Startcodon eines Enzyms der

Testosteronbiosynthese (Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie). Die Analyse der *HSD17B3*-Mutation p.0? mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 39). Da die Mutation p.0? das Startcodon ATG des Enzyms HSD17B3 betrifft, sind apathogene Einschätzungen dieser Mutation zu diskutieren und eine mögliche Beeinflussung der Translationsinitiation durch das mutierte Startcodon in Betracht zu ziehen. Bei Fall 6 ist klinisch ein PAIS-ähnlicher Phänotyp beschrieben (3.7, Tab. 34), was auf Einflüsse männlicher Sexualsteroiden hinweist (Acherman und Hughes, 2011). Ab Position 87 der *HSD17B3*-Sequenz bilden die Basen aus zwei Codons die Abfolge ATG (Referenzsequenz NM_000197.1). Würde dies als Translationsinitiation verwendet werden, würde eine Verschiebung des Leserahmens direkt zu Beginn der *HSD17B3*-Sequenz zu einer fehlerhaften, von HSD17B3 abweichenden, Aminosäureabfolge führen. Da somit keine funktionsfähige HSD17B3 gebildet werden könnte, würden die HSD17B3-Funktionen fehlen (Andersson et al., 1996). Jedoch findet sich innerhalb der Wildtyp-*HSD17B3*-Sequenz ein ATG-Codon an Position 141 (Referenzsequenz NM_000197.1). Dieses könnte ein neues Startcodon ohne Verschiebung des nachfolgenden Codon-Leserahmens darstellen. In der Aminosäuresequenz stellt dieses ATG-Codon an Position 141 die 47. Aminosäure, Methionin, dar. Beginnt die Aminosäuresequenz des Enzyms HSD17B3 erst mit dieser 47. Aminosäure, entsteht ein um 46 Aminosäuren verkürztes Enzym. Hieraus könnte eine Funktionsbeeinträchtigung der HSD17B3-Aktivität (Andersson et al., 1996) resultieren. Da jedoch Codon 141 in der *HSD17B3*-Wildtypsequenz die Aminosäure Methionin codiert und somit keine Verschiebung des Leserahmens erfolgt, wäre die nachfolgende Aminosäuresequenz intakt. Hierdurch könnte auch eine (Rest-) Funktion zur Hormonbildung (Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie) vorliegen. Hiermit könnte der PAIS-ähnliche Phänotyp (3.7, Tab. 34) als Hinweis auf Vorhandensein und Wirkung männlicher Sexualsteroiden (Acherman und Hughes, 2011) erklärt werden. Auch könnten Isoenzyme oder anderweitige Synthesewege der Testosteronproduktion die Auswirkungen einer *HSD17B3*-Mutation abschwächen (Andersson et al., 1996 und Boehmer et al., 1999). Zudem ist eine alternative DHT-Produktion ausgehend von 17-Hydroxyprogesteron anstatt über Testosteron

denkbar („backdoor pathway“), wodurch androgenregulierte Prozesse bei einem Testosteronsynthesedefekt kompensiert werden könnten (Auchus, 2004). Wie bei Fall 6 (3.7, Tab. 34) zeigen weitere Fallbeschreibungen von *HSD17B3*-Mutationen Auffälligkeiten der äußeren Genitalorgane wie Micropenis/Clitoromegalie, Hypospadie und labienähnliches Scrotum (Galli-Tsinopoulou et al., 2018). Die zweite Mutation findet sich bei Fall 6 im Gen *ZFPM2* (p.His320Arg) (3.7, Abb. 4 B, Tab. 32). Die Analyse der *ZFPM2*-Mutation p.His320Arg mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, Mutation-Assessor, fathmm und Mutation-Taster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 39). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Histidin gegen Arginin tauscht zwei Aminosäuren mit basischer Seitenkette gegeneinander aus. Die Seitenkette des Histidins ist verglichen mit der des Arginins verkürzt und enthält zudem einen Imidazolring. Imidazolring und Seitenkettenlänge könnten eine strukturelle und/oder funktionelle Bedeutung haben, sodass dieser Austausch von Histidin gegen Arginin eine pathogene Konsequenz für Struktur und/oder Funktion des Proteins *ZFPM2* haben könnte. Beschriebene DSD-Fälle mit *ZFPM2*-Mutationen sind durch intergeschlechtlich ausgebildete Genitalorgane und atypische Hodenhistologie charakterisiert (Bashamboo et al., 2014), Auffälligkeiten der Geschlechtsorganentwicklung finden sich auch bei Fall 6 (3.7, Tab. 34). Die molekularen Mechanismen beider bei Fall 6 mutierten Gene können eine Erklärungsmöglichkeit für den beschriebenen Phänotyp (3.7, Tab. 34) darstellen (Andersson et al., 1996 und Bashamboo et al., 2014 und Boehmer et al., 1999). Auch der Vergleich des Phänotyps von Fall 6 mit anderen DSD-Fällen mit *HSD17B3*- oder *ZFPM2*-Mutation kann den bei Fall 6 beschriebenen Phänotyp (3.7, Tab. 34) weder eher *HSD17B3* noch *ZFPM2* zuordnen (Andersson et al., 1996 und Bashamboo et al., 2014 und Boehmer et al., 1999 und Kolesinska et al., 2018). Bei Fall 6 sind die Auffälligkeiten der äußeren Geschlechtsorgane ausgehend von einem weiblich entwickelten Phänotyp beschrieben (3.7, Tab. 34), zudem ist ein Aufwachsen als weibliches Kind dokumentiert (3.7). Der Phänotyp ähnelt somit einem „schweren PAIS“ (Hughes et al., 2012). Zugrunde liegen kann diesem überwiegend weiblich entwickelten Phänotyp eine oligogene DSD-Entstehung durch eine kombinierte Wirkung (Camats et al., 2020 und Kouri et al., 2021) der bei Fall 6 vorliegenden Mutationen in *HSD17B3* und *ZFPM2*.

4.8 Dem PAIS-ähnlichen Phänotyp bei Fall 7 liegt eine Mutation in *KISS1* (p.Pro95Ser) zugrunde

4.8.1 Physiologische Funktion und Pathophysiologie des Gens *KISS1*

KISS1 codiert für als Kisspeptine bezeichnete Peptide, nach ihrer Aminosäureanzahl werden diese als Kisspeptin-54, -14, -13, -10 bezeichnet (Kotani et al., 2001 und Oakley et al., 2009). Mit ihrer identischen carboxy-terminalen Sequenz binden und aktivieren Kisspeptine den G-Protein-gekoppelten Rezeptor KISS1R (Kotani et al., 2001 und Ohtaki et al., 2001). Das KISS1/KISS1R-System stellt einen zentralen Regulator des Hypothalamus-Hypophysen-Gonadensystems dar, über die Beeinflussung der GnRH-Sekretion werden Pubertätsentwicklung und Reproduktion gesteuert (Gianetti und Seminara, 2008 und Oakley et al., 2009 und Tena-Sempere, 2005). Bereits in den ersten Lebensmonaten ist bei männlichen Neugeborenen/Säuglingen das Hypothalamus-Hypophysen-Gonadensystem aktiv, LH und FSH sowie Testosteron sind erhöht messbar (Andersson et al., 1998 und Forest et al., 1974). Dieser Vorgang wird als Mini-Pubertät bezeichnet (Copeland und Chernausk, 2016 und Lanciotti et al., 2018). *KISS1R*-Mutationen können einen mini-pubertären hypogonadotropen Hypogonadismus verursachen, was auf eine Beteiligung des KISS1/KISS1R-Systems an der Mini-Pubertät hinweisen könnte und eine Beeinträchtigung im späteren (pubertären) Entwicklungsverlauf nahelegt (Seminara et al., 2008 und Semple et al., 2005). Eine *in vivo* Regulation der Gonadotropine und Testosteron durch das KISS1/KISS1R-System wurde durch die intravenöse Gabe von Kisspeptin-54 mit nachfolgendem Anstieg der Hormonwerte gezeigt (Dhillon et al., 2005).

4.8.2 *Kiss1*-Knockout Mausmodell

Kiss1-Knockout-Mäuse fallen durch Hypogonadismus, ausbleibende Pubertätsentwicklung und beeinträchtigte Geschlechtsentwicklung auf (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007 und Lapatto et al., 2007). Auffälligkeiten der Genitalorgane zeigen sich bei männlichen *Kiss1*-Knockout-Mäusen durch reduzierte Hodenvolumina, Micropenis und verringerte Keimzellentwicklung (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007 und Lapatto et al., 2007).

4.8.3 Fall 7 ist der erste 46,XY DSD-Fall mit Mutation in *KISS1*

Eine Mutation in *KISS1* ist an einem Fallbericht von vier betroffenen Schwestern dokumentiert (Topaloglu et al., 2012). Mutationen im Gen *KISS1* werden rezessiv vererbt (Topaloglu et al., 2012). Im hier dargestellten Fall handelt es sich jedoch um einen genetisch männlichen Betroffenen mit der *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser (3.8, Abb. 5, Tab. 32). Die Analyse der *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 40). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Prolin gegen Serin tauscht eine Aminosäure mit apolarer Seitenkette (Prolin) gegen eine Aminosäure mit ungeladener polarer Seitenkette (Serin) aus. Zudem bildet die Seitenkette des Prolins eine Ringstruktur. Die Änderung einer apolaren zu einer polaren Seitenkette sowie die Änderung der Seitenkettenstruktur könnte die Struktur und/oder Funktion des Proteins *KISS1* beeinträchtigen und die mögliche Pathogenität der Mutation p.Pro95Ser erklären. Ein phänotypischer Vergleich des Falls 7 (3.8, Tab. 34) mit *Kiss1*-Knockout-Mäusen zeigt, dass Micropenis und reduziertes Hodenvolumen sowohl bei Fall 7 (3.8, Tab. 34) als auch in der Charakterisierung männlicher *Kiss1*-Knockout-Mäuse zu finden sind (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007 und Lapatto et al., 2007). Das junge Alter des Falls 7 (zweites Lebensjahr) könnte auf eine Beteiligung des *KISS1*/*KISS1R*-Systems an der embryonalen/fetalen Genitalorgandifferenzierung hinweisen (Lapatto et al., 2007, 4.8.4). Zudem kann die Erhöhung der Gonadotropin- und Testosteronwerte in den ersten Säuglingsmonaten (Andersson et al., 1998 und Forest et al., 1974) *KISS1*-mutationsbedingt beeinträchtigt gewesen sein (Seminara et al., 2008 und Semple et al., 2005), (4.8.4).

4.8.3.1 Diskussion der Hormonwerte von Fall 7

Für Fall 7 sind Ergebnisse von Hormonwertmessungen vorhanden (Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung). Hierdurch ist ein Vergleich mit Referenzwerten (Bidlingmaier, 2019 a und Bidlingmaier, 2019 b und Konforte et al., 2013) und den Hormonwerten der *Kiss1*-Knockout-Mäuse (Lapatto et al., 2007) sowie der beschriebenen Schwestern mit *KISS1*-Mutation (Topaloglu et al., 2012) möglich. Bei Fall 7 befindet sich der basale Testosteronwert von 0,1 nmol/L (Tab. 34) innerhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs

(Konforte et al., 2013), nach einem hCG-Test zur Stimulation der Testosteronsekretion liegt ein Testosteronwert von 3,1 nmol/L (88 ng/dL) vor (Tab. 34) (1.8, anonymisierte Einsendung). Nach Bidlingmaier, 2019 b ist dies als unzureichender Testosteronanstieg nach hCG-Stimulation zu werten (Bidlingmaier, 2019 b). Ein Vergleich der basalen und stimulierten Testosteronwerte von Fall 7 (Tab. 34) und *Kiss1*-Knockout-Mäusen zeigt, dass sich die basalen Testosteronwerte jeweils innerhalb der Referenzbereiche befinden (Konforte et al., 2013 und Lapatto et al., 2007), die Testosteronstimulationswerte jedoch unterhalb der jeweiligen Referenzbereiche liegen (Bidlingmaier, 2019 b und Lapatto et al., 2007). Bei Fall 7 liegen basale und stimulierte Werte für FSH und LH (3.8, 1.8, anonymisierte Einsendung) innerhalb der Referenzbereiche von Bidlingmaier, 2019 a. Im Vergleich dazu zeigen *Kiss1*-Knockout-Mäuse normale basale LH-Werte sowie stimulierbare Gonadotropine, jedoch verminderte basale FSH-Werte (Lapatto et al., 2007). Bei den von Topaloglu et al., 2012 beschriebenen Schwestern mit *KISS1*-Mutation sind basales FSH und LH reduziert, zudem zeigt die Indexpatientin von Topaloglu et al., 2012 reduzierte FSH- und LH-Werte nach GnRH-Stimulation (Topaloglu et al., 2012). Möglicherweise könnte bei Fall 7 der stimulierte LH-Wert auffällig sein, da vom identischen basalen FSH- und LH-Ausgangswert (je 0,5 IU/L) der stimulierte LH-Wert (3,2 IU/L) den stimulierten FSH-Wert (3,3 IU/L) nicht übersteigt, sondern sogar minimal niedriger ist (3.8, 1.8, anonymisierte Einsendung). Ein reduzierter LH-Anstieg und eine Umkehrung des LH/FSH-Quotienten sprechen für einen hypogonadotropen Hypogonadismus (Melmed et al., 2011). Eine Einordnung des LH-Anstiegs sowie des LH/FSH-Quotienten nach Melmed et al., 2011 könnte erst in der Pubertätsentwicklung (Seminara et al., 2008) von Fall 7 aussagekräftig sein. In den ersten Lebensmonaten erfolgt zunächst ein Anstieg der Hormone des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems, ab Mitte des ersten Lebensjahres sind die Hormonwerte auf das präpubertäre Level gesunken (Forest et al., 1974). Daher erfolgte eine Beurteilung der vorhandenen Hormonwerte und der Stimulationstests von Fall 7 (Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung) mittels der angegebenen Referenzbereiche (Bidlingmaier, 2019 a und Bidlingmaier, 2019 b und Konforte et al., 2013), die teilweise allgemein das Kleinkindalter oder auch das präpubertäre Stadium umfassen. Im Verlauf der Entwicklung könnten sich somit um die Zeit der Pubertät (Seminara et al., 2008) bei Fall 7 erniedrigte basale wie stimulierte Gonadotropine gezeigt haben, wie es für die weiblichen Fälle von *KISS1*-Mutationen beschrieben ist (Topaloglu et al., 2012).

4.8.3.2 Diskussion der Bedeutung der *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser

Die charakterisierte *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser (3.8, Abb. 5, Tab. 32) in der Kisspeptin-54-Sequenz (Referenzsequenz NM_002256.4) liegt in der genomischen DNA heterozygot vor (3.8, Abb. 5 A), in der cDNA ist jedoch nur die mutierte Sequenz nachweisbar (3.8, Abb. 5 B). Somit wird nur das mutierte *KISS1*-Allel exprimiert. Erklärungsmöglichkeiten für eine beeinträchtigte Expression des Wildtypallels stellen außerhalb der codierenden *KISS1*-Sequenz liegende Mutationen sowie eine Beeinflussung der Wildtyp-Expression durch das mutiert vorliegende Allel oder Genprodukt dar. Ohne Expression des Wildtypallels ist ein Ausgleich der heterozygoten Mutation unmöglich. Für Fall 7 bedeutet dies, dass nur das mutierte Kisspeptin-54 gebildet wird (3.8, Abb. 5 B). Führt die Mutation zu einer Beeinflussung von Proteinbildung oder Proteinstabilität, würde das mutierte Kisspeptin-54 zusätzlich reduziert vorhanden sein. Die *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser (3.8, Abb. 5, Tab. 32) liegt außerhalb der Bindungsdomäne für den KISS1R (Kotani et al., 2001 und Ohtaki et al., 2001). Über möglicherweise verringerte Konzentrationen von Kisspeptin-54, verursacht durch die *KISS1*-Mutation p.Pro95Ser in der Kisspeptin-54-Sequenz, ist jedoch denkbar, dass eine Aktivierung des KISS1R/des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems (Dhillon et al., 2005) vermindert wäre. Zusätzlich könnte instabiles oder reduziert vorhandenes Kisspeptin-54 die Menge der kürzeren Kisspeptide, Kisspeptin-14, -13, -10, verringern (Kotani et al., 2001). Fehlerhafte oder fehlende Kisspeptide können das Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems beeinträchtigen, wie bei den weiblichen Individuen mit *KISS1*-Mutation kann dies zu Auffälligkeiten von Geschlechtsentwicklung, Hormonsystem und Pubertät führen (Topaloglu et al., 2012).

4.8.4 Fallbeschreibungen mit Mutationen im Kisspeptinrezeptor *KISS1R*

Im Gegensatz zu *KISS1* sind für den Kisspeptinrezeptor *KISS1R* Mutationen mit homozygoter/compound heterozygoter Ausprägung bei mehreren Individuen beschrieben, phänotypisch zeigen sich unterentwickelte externe Genitalorgane, Hypospadien, verminderte Hodenvolumina, eine reduzierte Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale, verzögerte Pubertätsentwicklung sowie ein hypogonadotroper Hypogonadismus (Demirbilek et al., 2015 und de Roux et al., 2003 und Lanfranco et al., 2005 und Seminara et al., 2003 und Semple et al., 2005). Die Charakterisierung eines männlichen Kindes mit *KISS1R*-Mutation ergibt phänotypisch einen Micropenis sowie einen einseitigen Maldescensus

testis (Semple et al., 2005). Zudem liegen Hormonwertmessungen vor, die nicht messbare Werte für LH und FSH sowie eine beeinträchtigte Stimulierbarkeit der Gonadotropine und Testosteron zeigen (Semple et al., 2005). Mit Micropenis, Scrotum bifidum, Hypospadie, inguinalen Hoden sowie reduziertem Hodenvolumen (3.8, Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung) zeigt Fall 7 phänotypische Charakteristika, die auch für Fälle mit *KISS1R*-Mutationen beschrieben sind (Demirbilek et al., 2015 und de Roux et al., 2003 und Lanfranco et al., 2005 und Semple et al., 2005). Das Alter des in dieser Arbeit beschriebenen Individuums mit *KISS1*-Mutation beträgt 13 Monate (3.8), sodass die Ausprägung des beschriebenen DSD-Phänotyps (3.8, Tab. 34) in diesem frühen Lebensalter auf eine Beteiligung des *KISS1/KISS1R*-Systems an der embryonalen/fetalen Genitalorgandifferenzierung hinweisen könnte (Lapatto et al., 2007). Bei *Kiss1*- und *Kiss1r*-Knockout-Mäusen sind Auffälligkeiten der Geschlechtsentwicklung sowie eine Verkürzung der anogenitalen Distanz feststellbar (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007 und Lapatto et al., 2007). Die anogenitale Distanz dient als Marker einer Androgenexposition, sodass eine Verkürzung auf einen Androgenmangel zurückzuführen ist (Pakarainen et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass das *Kiss1/Kiss1r*- sowie *KISS1/KISS1R*-System bisher noch nicht bekannte Funktionen innerhalb des Sexualsteroidstoffwechsels und der Geschlechtsentwicklung hat (Lapatto et al., 2007). So könnte beispielsweise ein möglicher Mangel an Androgenen (Lapatto et al., 2007 und Pakarainen et al., 2005) und eine Störung der Geschlechtsentwicklung bei *KISS1*- sowie *KISS1R*-Mutation (Lapatto et al., 2007) der Entstehung eines PAIS-ähnlichen Phänotyps zugrunde liegen, wie bei Fall 7 mit Micropenis, Scrotum bifidum, Hypospadien und Maldescensus testis beschrieben (3.8, Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung). Der von Semple et al., 2005 charakterisierte Säugling mit *KISS1R*-Mutation zeigt mit reduzierten LH- und FSH-Werten eine beeinträchtigte Aktivität des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems im zweiten Lebensmonat (Semple et al., 2005). Demnach könnte das *KISS1/KISS1R*-System an der Aktivität des Hypophysen-Gonaden-Systems in den ersten Lebensmonaten beteiligt sein (Seminara et al., 2008 und Semple et al., 2005). Bei Fall 7 liegen jedoch normale basale Werte für LH und FSH vor (3.8, 1.8, anonymisierte Einsendung). Verglichen mit einer *KISS1R*-Mutation und somit einer Mutation des Rezeptors für alle Kisspeptine resultiert möglicherweise eine geringere Beeinträchtigung des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems durch eine alleinige Kisspeptin-54 Mutation. Jedoch könnte in den ersten

Lebensmonaten die *KISS1*-Mutation des Falls 7 die Aktivität des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems beeinträchtigt haben (Seminara et al., 2008 und Semple et al., 2005), sodass in der Mini-Pubertät (Lanciotti et al., 2018) reduzierte Hormonlevel der Gonadotropine sowie der Sexualhormone vorgelegen haben könnten. Somit könnte sich die *KISS1*-Mutation von Fall 7 besonders in aktiven Phasen des Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Systems wie Mini-Pubertät und Pubertät (Gianetti und Seminara, 2008 und Oakley et al., 2009 und Seminara et al., 2008) funktionsbeeinträchtigend auswirken.

4.9 Genmutationen in endocytotischen Rezeptoren kommen bei DSD-Fällen vor

4.9.1 Endocytose als zielgerichteter Substanztransport

Endocytose wurde anhand der LDL (Low-density Lipoprotein) -Aufnahme als zielgerichteten Aufnahmeprozess durch Zellen dargestellt, die einen Rezeptor für die zu transportierende Substanz tragen (Brown et al., 1975 und Brown et al., 1976 und Robinson, 2015). Störungen des Endocytosemechanismus resultieren aus Mutationen im Rezeptor der Zielzellen mit beeinträchtigter Ligandenbindung (Goldstein et al., 1975 und Robinson, 2015) oder durch Störung der Rezeptorinteraktion mit weiteren an der Endocytose beteiligten Strukturen (Anderson et al., 1977 und Brown et al., 1976 und Robinson, 2015).

4.9.2 Nachweis von LRP2

Das Molekulargewicht von LRP2 liegt in den betrachteten Genitalhautfibroblasten bei circa 200 - 250 kDa (Abb. 7 A). Vergleichbare Größenangaben für LRP2 im SDS-Gel wurden publiziert (Anzenberger et al., 2006 und Petersen et al., 2003 und Willnow et al., 1992). Der erste Nachweis von Megalin im Western Blot zeigt ein Molekulargewicht von circa 330 kDa (Kerjaschki und Farquhar, 1983). Aufgrund der Klonierung von Megalin wurde ein Molekulargewicht von circa 500 kDa beschrieben (Saito et al., 1994), auch ein circa 500 kDa LRP2 ist mittels Western Blot nachweisbar (Orlando et al., 1992). Somit unterscheidet sich das Molekulargewicht des klonierten Megalins (Saito et al., 1994) von *in vivo* gebildetem LRP2 der Genitalhautfibroblasten (3.9.3, Abb. 7). In den betrachteten Genitalhautfibroblasten könnten LRP2-Spleißvarianten diesem Unterschied der Molekulargewichte zugrunde liegen, die möglicherweise zelltypspezifisch und funktionsadaptiert gebildet werden (Nykjaer und Willnow, 2002).

4.9.3 *LRP2*-Mutationen verursachen Mittelliniendefekte

Homozygote *LRP2*-Mutationen verursachen das Donnai-Barrow-Syndrom, hierfür ist eine Agenesie der Mittellinienstruktur Corpus callosum charakteristisch (Chassaing et al., 2003 und Donnai und Barrow, 1993 und Kantarci et al., 2007). Zurückgeführt werden kann dies auf die Beteiligung des *LRP2* an Sonic Hedgehog-vermittelten Entwicklungsprozessen (Christ et al., 2012 und Christ et al., 2016 und Willnow et al., 2007). Bei Fall 8 liegt mit einer Agenesie des Septum pellucidum (3.9.1, anonymisierte Einsendung) das Fehlen einer sich unterhalb des Corpus callosum befindenden Mittellinienstruktur vor. Möglich ist, dass dies auf die drei *LRP2*-Mutationen (3.9.1, Abb. 6 A - 6 C, Tab. 32) und die erniedrigte *LRP2*-Proteinexpression bei Individuum 8 (3.9.3, Abb. 7 A, Abb. 7 B) zurückzuführen ist.

4.9.4 Heterozygote Mutationen im Gen *LRP2* sind bei DSD-Phänotypen zu finden

Bei zwei der in dieser Arbeit analysierten DSD-Fällen sind *LRP2*-Mutationen nachweisbar (3.9). Bei Fall 8 finden sich die drei heterozygoten *LRP2*-Mutationen p.Ser1707Phe, p.Thr2086Ser und p.Ile3389Val (3.9.1, Abb. 6 A - 6 C, Tab. 32). Die Analyse der *LRP2*-Mutation p.Ser1707Phe mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, Mutation-Assessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 41). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Serin gegen Phenylalanin tauscht eine Aminosäure mit ungeladener polarer Seitenkette gegen eine Aminosäure mit apolarer Seitenkette aus. Zudem enthält die Seitenkette des Phenylalanins eine aromatische Ringstruktur. Die Einstufung der Mutation p.Ser1707Phe als benigne ist nicht nachvollziehbar, da sowohl die Änderung der Seitenkettenpolarität als auch die ringförmige Seitenkettenstruktur des Phenylalanins Auswirkungen dieses Aminosäureaustauschs auf Struktur und/oder Funktion des Proteins *LRP2* annehmen lassen. Die Analyse der *LRP2*-Mutation p.Thr2086Ser mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 41). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Threonin gegen Serin tauscht zwei Aminosäuren mit ungeladenen polaren Seitenketten aus. Die Seitenkette des Threonins enthält

eine zusätzliche Methylgruppe, deren Fehlen keine schwerwiegenden Auswirkungen auf Proteinstruktur und/oder -funktion annehmen lässt. Je nach Funktion des Threonins 2086 ist jedoch eine strukturelle oder funktionelle Beeinflussung von LRP2 durch die Mutation p.Thr2086Ser möglich. Die Analyse der *LRP2*-Mutation p.Ile3389Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einordnung als pathogene Mutation (Tab. 41). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Isoleucin gegen Valin tauscht zwei Aminosäuren mit apolaren Seitenketten gegeneinander aus. Valin zeigt verglichen mit dem ursprünglichen Isoleucin eine um eine Methylengruppe verkürzte Seitenkette, diese ist jedoch ebenfalls verzweigt sowie apolar. Nach den Ergebnissen der Mutationsanalyse (Tab. 41) ist eine Auswirkung des Aminosäureaustauschs p.Ile3389Val auf Struktur und/oder Funktion des Proteins LRP2 anzunehmen und könnte aus der kürzeren Seitenkette des Valins resultieren. Unter Berücksichtigung der Allelfrequenzen, die für die drei LRP2-Mutationen von Fall 8 zu finden sind (Tab. 32), ist die Mutation p.Ser1707Phe aufgrund ihrer Seltenheit am ehesten die Ursache für den vorliegenden DSD-Phänotyp. Die weiteren beiden LRP2-Mutationen von Fall 8 sind aufgrund ihrer Allelfrequenzen (Tab. 32) vermutlich zu häufig, um eine mögliche DSD-Ursache darzustellen. Bei Fall 9 liegt die heterozygote *LRP2*-Mutation p.Glu3763Val vor (3.9.2, Abb. 6 D, Tab. 32). Die Analyse der *LRP2*-Mutation p.Glu3763Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einordnung als pathogene Mutation (Tab. 41). Der Aminosäureaustausch von Glutamat gegen Valin tauscht eine Aminosäure mit saurer Seitenkette (Glutamat) gegen eine Aminosäure mit apolarer und verzweigter Seitenkette (Valin) aus. Apolarität und Seitenkettenstruktur des Valins könnten der möglichen Pathogenität der Mutation p.Glu3763Val zugrunde liegen und sich strukturell sowie funktionell auf das Protein LRP2 auswirken. Fall 8 und Fall 9 zeigen einen PAIS-ähnlichen Phänotyp (3.9.1, 3.9.2, Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung). Durch Sequenzierung des jeweiligen Exoms konnten Mutationen in den codierenden Gensequenzen bekannter DSD-Gene (4.12) ausgeschlossen werden. Bisher ist *LRP2* kein DSD-assoziiertes Gen beim Menschen (4.12), im Exom von Fall 8 wie Fall 9 wurden jedoch Genmutationen in *LRP2* nachgewiesen (3.9.1, 3.9.2, Abb. 6, Tab. 32). Bei Fall 8 finden sich die drei heterozygoten *LRP2*-Mutationen p.Ser1707Phe, p.Thr2086Ser und p.Ile3389Val (3.9.1, Abb. 6 A - 6 C,

Tab. 32), die LRP2-Proteinexpression in Genitalhautfibroblasten von Fall 8 zeigt eine Reduktion von LRP2 um circa 65 % (Abb. 7 A, Abb. 7 B). Bei Fall 9 liegt die heterozygote *LRP2*-Mutation p.Glu3763Val vor (3.9.2, Abb. 6 D, Tab. 32), die LRP2-Proteinexpression in Genitalhautfibroblasten von Fall 9 zeigt eine Reduktion von LRP2 um circa 55 % (Abb. 7 A, Abb. 7 C). Gemeinsam ist Fall 8 und Fall 9 das Vorliegen von *LRP2*-Mutationen (3.9.1, 3.9.2, Abb. 6, Tab. 32) und zugleich der fehlende Nachweis von Mutationen in bereits bekannten, DSD-assoziierten Genen (4.12). Somit habe ich bei zwei Individuen mit sehr ähnlichem DSD-Phänotyp (3.9.1, 3.9.2, Tab. 34) mit *LRP2* ein neues Gen gefunden, das bei beiden DSD-Individuen Mutationen zeigt (3.9.1, 3.9.2, Abb. 6, Tab. 32) und daher mit der jeweiligen DSD-Entstehung im Zusammenhang stehen könnte. Somit soll durch diese Arbeit ein Erklärungsmodell erstellt werden, das *LRP2*-Mutationen als ursächlich für die DSD-Ausprägung beim Menschen darlegen kann. Ein Maldescensus testis (Hodenhochstand) ist bei beiden *LRP2*-Fällen (3.9.1, 3.9.2, Tab. 34, anonymisierte Einsendung) dokumentiert. Als phänotypisches Charakteristikum verbindet der Maldescensus testis Fall 8 und Fall 9 mit männlichen *Lrp2*-Knockout-Mäusen, für welche ebenfalls ein Hodenhochstand beschrieben ist (Hammes et al., 2005). Anhand dieser *Lrp2*-Knockout-Mäuse wurde gezeigt, dass eine endocytotische Aufnahme des Testosteron-SHBG-Komplexes durch Megalin erfolgt (Hammes et al., 2005). Dieser Endocytoseprozess ist bei *Lrp2*-Knockout beeinträchtigt und resultiert in einem Maldescensus testis (Hammes et al., 2005). Ein LRP2-vermittelter Endocytoseprozess für die Aufnahme von Sexualsteroiden in hormonelle Zielzellen (Hammes et al., 2005) könnte somit auch beim Menschen vorliegen und bei DSD mit *LRP2*-Mutationen beeinträchtigt sein. Die bei DSD-Fall 8 und DSD-Fall 9 nachgewiesenen *LRP2*-Mutationen sowie die jeweils resultierende verminderte LRP2-Expression (3.9.3, Abb. 7) könnte die Kapazität einer LRP2-vermittelten Endocytose in hormonelle Zielzellen (Hammes et al., 2005) reduzieren. Zusätzlich könnte die endocytotische Funktion (Hammes et al., 2005) des vorhandenen LRP2 mutationsbedingt eingeschränkt sein. Da gezeigt ist, dass eine Aufnahme des Testosteron-SHBG-Komplexes endocytotisch durch Megalin erfolgt (Hammes et al., 2005), könnten die *LRP2*-Mutationen bei Fall 8 und Fall 9 (Tab. 34) einer beeinträchtigten endocytotischen Testosteronaufnahme in Zielzellen zugrunde liegen und hierüber den DSD-Entstehungsmechanismus darstellen: Trotz Vorhandensein von Liganden (Testosteron/DHT) und intaktem Rezeptor (AR) könnten androgenabhängige

Prozesse gestört werden, wenn eine defekte endocytotische Hormonaufnahme durch Megalin die intrazelluläre Hormonkonzentration verringert. Die Möglichkeit einer durch LRP2-Defizienz verursachten Reduktion der intrazellulären Androgenkonzentration wird durch das vorliegende Ergebnis der biochemischen AR-Charakterisierung (1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) unterstützt. Diese zeigt bei beiden Fibroblastenzelllinien mit *LRP2*-Mutationen eine verminderte DHT-Bindung, beschrieben als quantitativen AR-Defekt (3.9.1, 3.9.2, Tab. 33, Schönau et al., 1990 und 1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Zur Bestimmung der Bindungskapazität des AR wurden intakte Genitalhautfibroblasten verwendet (Schweikert et al., 1989). Zeigt sich eine verminderte DHT-Bindung, ist eine mutationsbedingte Beeinträchtigung des AR eine Erklärungsmöglichkeit. Bei beiden Fällen mit *LRP2*-Mutationen ist jedoch keine AR-Mutation nachweisbar. Die erniedrigte DHT-Bindung der Genitalhautfibroblasten bei *LRP2*-Mutationen könnte somit durch eine verminderte endocytotische Androgenaufnahme verursacht sein. Durch *LRP2*-mutationsbedingte Reduktion der endocytotischen Aufnahmeaktivität von Testosteron durch LRP2 wäre in Zielzellen eine erniedrigte Testosteronkonzentration und somit reduzierte DHT-Bildung zu erwarten. Eine verminderte intrazelluläre Ligandenkonzentration würde zu reduzierter Liganden-Rezeptor-Bindung und somit zum biochemisch beschriebenen quantitativen AR-Defekt (1.8, 3.9.1, 3.9.2, Tab. 33, Schönau et al., 1990 und ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) führen. Aus dieser verringerten Bildung von AR-DHT-Komplexen könnte eine reduzierte Stimulation der androgenregulierten Genexpression in Zielzellen (Achermann und Hughes, 2011) resultieren. Eine hierdurch beeinträchtigte androgenabhängige Genexpression im Rahmen der männlichen Geschlechtsentwicklung könnte sich phänotypisch als PAIS-ähnlich mit Auffälligkeiten der äußeren Genitalorgane (Achermann und Hughes, 2011) zeigen. Anhand des *Lrp2*-Knockout Mausmodells von Hammes et al. wurde Megalin als entscheidend für Steroidhormonaufnahme und Descensus testis nachgewiesen (Hammes et al., 2005), sodass eine *LRP2*-mutationsbedingte Beeinträchtigung dieser Prozesse die DSD-Phänotypen der Fälle 8 und 9 (3.9.1, 3.9.2, Tab. 34) wie beschrieben erklären könnte. Ein weiterer, unabhängiger Hinweis auf eine Einschränkung der LRP2-Funktion kann der mit einer Agenesie des Septum pellucidum (3.9.1, anonymisierte Einsendung) milde Mittelliniendefekt von Fall 8 sein (Christ et al., 2012 und Christ et al., 2016 und Willnow et al., 2007).

4.9.5 Vergleich der Hormonwerte von Fall 8 und Fall 9 mit Referenzwerten

Für Fall 8 liegt der gemessene Wert für Testosteron basal von 4,8 nmol/L (Tab. 34) etwas oberhalb des präpubertären oberen Referenzwertes (Bidlingmaier, 2019 b), wurde jedoch in den vorliegenden Unterlagen nicht als auffällig bewertet (1.8, anonymisierte Einsendung). Die stimulierten Testosteronwerte von Fall 8 (Tab. 34, anonymisierte Einsendung) sind als normal zu werten (Bidlingmaier, 2019 b). Nach den altersentsprechenden Grenzwerten und Referenzbereichen sind für Fall 9 basale (nach Konforte et al., 2013) sowie stimulierte (nach Bidlingmaier, 2019 b) Testosteronwerte (Tab. 34) und die gemessenen basalen Werte für FSH und LH (3.9.2) (nach Konforte et al., 2013) als normal einzuordnen (1.8, anonymisierte Einsendung). Die Kombination von normalen Testosteronwerten und reduzierter männlicher Phänotypentwicklung ist für Androgeninsensivitätssyndrome beschrieben, denen *AR*-Mutationen zugrunde liegen (Hughes et al., 2012). Fall 8 und Fall 9 zeigen jedoch keine Mutationen im *AR*. Die *LRP2*-Mutationen von Fall 8 und Fall 9 (3.9.1, 3.9.2, Tab. 32) könnten jedoch durch indirekte Beeinträchtigung der *AR*-Funktion (4.9.4, 4.11) diese scheinbare Androgeninsensivität verursachen.

4.10. Der Lipocalinrezeptor 1 (LMBR1L)

LMBR1L (Limb Development Membrane Protein 1 Like) auf Chromosom 12 codiert für ein als Lipocalin-1 Interacting Membrane Receptor bezeichnetes Protein mit einem Molekulargewicht von circa 55 kDa (Wojnar et al., 2001). Für *LMBR1L* wird in dieser Arbeit eine kürzere Bezeichnung, Lipocalinrezeptor 1, verwendet. Der *LMBR1L* besteht aus 487 Aminosäuren und ist ein Transmembranprotein der Zellmembran mit neun Transmembrandomänen, der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär lokalisiert (Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003). Der extrazelluläre N-Terminus stellt die Liganden-Interaktionsstruktur dar (Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003). *LMBR1L*-Expression ist beispielsweise in Hypophyse, Hoden, Nebenniere, Placenta, Brustdrüse und fetaler Lunge nachweisbar (Wojnar et al., 2001). Die Mobilität eines klonierten *LMBR1L* entspricht in der SDS-Page einem Molekulargewicht von circa 40 kDa (Hesselink und Findlay, 2013).

4.10.1 LMBR1L-Funktion

Für Rezeptoren der Lipocalinrezeptorfamilie mit ihren zugehörigen Liganden sind rezeptorvermittelte Endocytose und Zellmembran-assoziierte spalten-/ taschenähnliche Rezeptorstrukturen als Transportmechanismen beschrieben (Chen et al., 2016 und Fluckinger et al., 2008 und Kawaguchi et al., 2007 und Wojnar et al., 2003). Für LMBR1L ist ein endocytotischer Mechanismus für die zelluläre Aufnahme von - an LMBR1L gebundenen - Liganden mit deren jeweiliger Transportsubstanz charakterisiert (Fluckinger et al., 2008 und Wojnar et al., 2003). Endocytosesubstrate des LMBR1L werden als Lipocaline bezeichnet (Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003). Lipocaline stellen eine Binde- und Transportproteinfamilie dar (Godovac-Zimmermann, 1988). Ein Lipocalin ist spezifisch für Größe, Form und chemische Struktur seines Liganden, die jeweilige Ligandenbindungsstelle wird durch Aminosäuresequenz und Schleifenstruktur charakterisiert (Flower, 1995). Zu den Liganden der Lipocaline gehören Retinoide, Arachidonsäure/Prostaglandine und Steroide (Flower, 1996). Für das Lipocalin Apolipoprotein D (APOD) (Flower, 1996) ist als Ligand ein Geruchsmolekül der axillären apokrinen Schweißdrüsen beschrieben (Zeng et al., 1996). Aufgrund der *APOD*-Expression in Reproduktionsorganen und Nebennieren verschiedener Spezies sowie die Beeinflussung der *APOD*-Expression durch Steroide besteht die Theorie, dass *APOD* eine Steroidtransportfunktion haben könnte (Rassart et al., 2000). *APOD* wurde als in Genitalhautfibroblasten androgensensitives Gen (Appari et al., 2009) für den bereits beschriebenen *APOD* Assay (Hornig et al., 2016, 1.8) verwendet. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass über einen zwischen-geschalteten Faktor, MAGEA11 (melanoma antigen family member A11, *MAGEA11*), eine Verbindung zwischen LMBR1L und AR bestehen könnte: Für LMBR1L sind Interaktionen mit MAGEA11 nachweisbar (Yang et al., 2016). MAGEA11 (ehemals MAGE-11) wiederum interagiert mit dem N-Terminus des ligandenlosen AR im Cytoplasma und stellt einen Koregulator des AR dar, der dessen Transkriptionsaktivität steigert (Bai et al., 2005). Möglich ist somit, dass LMBR1L vermittelt über MAGEA11 die AR-Aktivität beeinflussen kann. Seit kurzem ist bekannt, dass *Lmbr1l* an der Differenzierung lymphatischer Zellen beteiligt ist (Choi et al., 2019). *Lmbr1l*-defiziente Mäuse weisen Auffälligkeiten der Immunzellen und des Immunsystems auf (Choi et al., 2019). Die Aufklärung des molekularen Mechanismus zeigt, dass bei der Lymphopoese *Lmbr1l*-defizienter Mäuse der *Wnt*/ β -Catenin-Signalweg irregulär aktiviert ist (Choi et al., 2019).

Ursächlich hierfür ist eine Defizienz seines negativen Regulators *Lmbr1l* (Choi et al., 2019). Hierdurch akkumuliert β -Catenin, das wiederum apoptotische Signalwege aktiviert und über eine gesteigerte Apoptose zu der beobachteten Lymphopenie führt (Choi et al., 2019). Aufgrund dieser Erkenntnisse über *Lmbr1l*-Knockout-Mäuse wird eine *LMBR1L*-Beeinträchtigung als mögliche Ursache von Immundefizienzen beim Menschen vorgeschlagen (Choi et al., 2019). Im Colon kann die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs zu Polypen bzw. zu einem Colocarcinom führen (Saif und Chu, 2010 und Segditsas und Tomlinson, 2006). Da bei den *Lmbr1l*-defizienten Mäusen jedoch keine Auffälligkeiten im Colon beschrieben wurden (Choi et al., 2019), kann (zumindest bei Mäusen) eine Redundanz des durch *Lmbr1l*-vermittelten Wnt/ β -Catenin Signalwegs für andere Zelltypen angenommen werden.

4.10.2 *LMBR1L* als möglicher neuer Rezeptor der endocytotischen Hormonaufnahme

LMBR1L ist beim Menschen bisher nicht mit Auffälligkeiten der Geschlechtsentwicklung oder des Sexualhormonstoffwechsels assoziiert (4.12). Die Analyse von 16 DSD-Exomdatensätzen zeigt bei drei Fällen heterozygote *LMBR1L*-Mutationen (3.10, Abb. 8, Tab. 32), die sich phänotypisch als PAIS-ähnlich darstellen (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 34). Durch den Nachweis der drei beschriebenen *LMBR1L*-Mutationen (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 32) bei 46,XY DSD-Fällen kann eine Beteiligung des *LMBR1L* an der Geschlechtsentwicklung und/oder dem Sexualhormonstoffwechsel angenommen werden. Als Transportfunktionen der Lipocalin- und Lipocalinrezeptorfamilien sind Aufnahmemechanismen über Endocytose und durch spalten- oder taschenähnliche Rezeptorstrukturen beschrieben (Chen et al., 2016 und Fluckinger et al., 2008 und Kawaguchi et al., 2007 und Wojnar et al., 2003), sodass ein Transportmechanismus für Sexualsteroiden über Lipocalinrezeptoren/*LMBR1L* vermittelt werden könnte. Für den hier untersuchten *LMBR1L* liegen Beschreibungen einer endocytotischen Funktion und einer funktionellen Ähnlichkeiten zu LRP2 vor (Fluckinger et al., 2008 und Hesselink und Findlay, 2013 und Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003). Somit könnte *LMBR1L* für die endocytotische Aufnahme von Sexualsteroiden in Zielzellen verantwortlich sein und hierfür einen Megalin-ähnlichen (Fluckinger et al., 2008 und Hammes et al., 2005 und Hesselink und Findlay, 2013 und Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003) Mechanismus darstellen. Auffällig ist, dass sowohl bei Fall 10 (p.Arg228Gln) als auch Fall 11 (p.Arg228Trp) das Codon 288

in *LMBR1L* betroffen ist (3.10.1, 3.10.2, Tab. 32). Zudem sind für beide Fälle ähnliche DSD-Phänotypen beschrieben (3.10.1, 3.10.2, Tab. 34). Der bei Fall 10 und Fall 11 zusätzlich fehlende Nachweis von Mutationen in bekannten DSD-assoziierten Genen (4.12) macht *LMBR1L* als mögliches ursächliches Gen für die beschriebenen DSD-Phänotypen (3.10.1, 3.10.2, Tab. 34) interessant. Anhand der nachgewiesenen Endocytose-Funktionen von *LMBR1L* (Fluckinger et al., 2008) lassen *LMBR1L*-Mutationen bei DSD-Fällen an ein mit Mutationen in *LRP2* vergleichbares DSD-Entstehungsmodell denken (4.9.4, 4.11, Hammes et al., 2005). Hierbei wären die DSD-Phänotypen bei *LMBR1L*-Mutationen (Tab. 32, Tab. 34) auf eine mögliche *LMBR1L*-vermittelte Sexualhormonendocytose zurückzuführen, die *LMBR1L*-mutationsbedingt beeinträchtigt sein könnte (4.10.7, 4.11). Die Analyse der *LMBR1L*-Mutation p.Arg228Gln mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt eine Einordnung als apathogenen Aminosäureaustausch (Tab. 42). Dies steht im Gegensatz zu den Proteinexpressionsergebnissen, die eine Beeinträchtigung der *LMBR1L*-Mutante p.Arg228Gln zeigen (Abb. 14 A - 14 C, Abb. 15 A - 15 C). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Glutamin tauscht eine Aminosäure mit basischer Seitenkette (Arginin) gegen eine Aminosäure mit ungeladener Seitenkette (Glutamin) aus. Die Mutation p.Arg228Gln könnte sich durch die nun beim Glutamin fehlende Ladung der Aminosäureseitenkette als pathogen zeigen, da diese Ladung des Arginins eine funktionelle Bedeutung für die *LMBR1L*-Struktur und/oder -Funktion haben könnte. Die Analyse der *LMBR1L*-Mutation p.Arg228Trp mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 42). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Arginin gegen Tryptophan tauscht eine Aminosäure mit basischer Seitenkette gegen eine Aminosäure mit apolarer Seitenkette aus. Zudem enthält die Seitenkette von Tryptophan einen Indolring. Der Austausch des Arginins mit geladener Seitenkette gegen eine apolare Aminosäure mit zudem durch den Indolring veränderter Seitenkettenstruktur passt sehr gut zu einer pathogenen Auswirkung der Mutation p.Arg228Trp auf Struktur und/oder Funktion des Proteins *LMBR1L*. Die dritte *LMBR1L*-Mutation, p.Ile39Val, zeigt Fall 6. Die Analyse der *LMBR1L*-

Mutation p.Ile39Val mit den Analysetools RVIS, PolyPhen-2, SIFT, MutationAssessor, fathmm und MutationTaster2 (Tab. 3) ergibt sowohl pathogene als auch apathogene Einordnungen und ermöglicht somit keine eindeutige Aussage (Tab. 42). Der Aminosäureaustausch (beurteilt mittels Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 2014) von Isoleucin gegen Valin tauscht zwei Aminosäuren mit apolaren und verzweigten Seitenketten gegeneinander aus. Die im Vergleich mit Isoleucin verkürzte Seitenkette des Valins könnte einer pathogenen Auswirkung der Mutation p.Ile39Val auf Struktur und/oder Funktion des Proteins LMBR1L zugrunde liegen. Fall 6 zeigt zusätzlich Mutationen in *HSD17B3* und *ZFPM2* (3.7, Abb. 4, Tab. 32), beide Mutationen betreffen DSD-assoziierte Gene (Andersson et al., 1996 und Bashamboo et al., 2014, 4.12). Fall 6 stellt neben Fall 5 den zweiten Fall in dieser Arbeit dar, der in mehreren DSD-assoziierten Genen Mutationen zeigt (Tab. 32, 4.12). Oligogene DSD-Entstehung (Camats et al., 2018 und Camats et al., 2020) stellt hierfür eine mögliche Erklärung dar. Möglich wäre auch, dass sich nicht jede der Mutationen phänotypisch ausprägt (Camats et al., 2015 und Kouri et al., 2021). Zudem könnte nicht (nur) die Auswirkung der einzelnen Mutationen, sondern besonders deren kombiniertes Vorkommen entscheidend sein (Camats et al., 2020 und Kouri et al., 2021).

4.10.3 Vergleich der Hormonwerte von Fall 10 und Fall 11 mit Referenzwerten

Für Fall 10 liegt der gemessene Wert für Testosteron basal von 110 nmol/L (Tab. 34, 1.8, anonymisierte Einsendung) innerhalb des altersentsprechenden Referenzbereichs (Konforte et al., 2013). Für Fall 11 (1.8, anonymisierte Einsendung) liegen die basalen Werte für Testosteron (Tab. 34), FSH und LH (3.10.2) (nach Konforte et al., 2013) sowie die stimulierten Werte für FSH und LH (3.10.2) (nach Bidlingmaier, 2019 a) innerhalb der altersentsprechenden Referenzbereiche. Die Kombination von normalen Testosteronwerten und reduzierter männlicher Phänotypentwicklung ist für Androgeninsensitivitätssyndrome beschrieben, denen *AR*-Mutationen zugrunde liegen (Hughes et al., 2012). Fall 10 und Fall 11 zeigen jedoch keine Mutation im *AR*. Die nachgewiesenen *LMBR1L*-Mutationen könnten durch indirekte Beeinträchtigung der *AR*-Funktion (4.10.7, 4.11) dieser scheinbaren Androgeninsensitivität zugrunde liegen.

4.10.4 Die *LMBR1L*-Mutationen von Fall 10 und Fall 11 wirken sich auf mRNA-Ebene aus. Für Fall 10 mit der Mutation p.Arg288Gln liegt in den Genitalhautfibroblasten ein signifikant erniedrigter *LMBR1L*-mRNA-Spiegel vor (Abb. 10 A). Die Bildung der p.Arg288Gln mRNA ist durch Sangersequenzierung der cDNA nachweisbar (Abb. 9 A). Somit kann der reduzierte *LMBR1L*-mRNA-Spiegel durch verringerte Produktion und/oder vermehrten Abbau entstehen, wenn bei der kotranslationalen Proteinfaltung die mRNA mutationsbedingt abgebaut wird. Der reduzierte *LMBR1L*-mRNA-Spiegel spricht dafür, dass keine Kompensation durch Steigerung der mRNA-Menge von *LMBR1L*-Mutante oder -Wildtyp erfolgt. Für Fall 11 mit der Mutation p.Arg288Trp liegt in den Genitalhautfibroblasten ein signifikant erhöhter Spiegel der *LMBR1L*-mRNA vor (Abb. 10 B). Die Bildung der p.Arg288Trp mRNA ist durch Sangersequenzierung der cDNA nachweisbar (Abb. 9 B). Der gesteigerte *LMBR1L*-mRNA-Spiegel spricht dafür, dass eine Erhöhung der mRNA von *LMBR1L*-Mutante p.Arg288Trp oder -Wildtyp zur Kompensation einer möglichen Beeinträchtigung des LMBR1L auf Proteinebene erfolgt.

4.10.5 Nachweis des LMBR1L

Es war schwierig, einen zuverlässigen LMBR1L-Antikörper zu finden, da es einerseits ein sehr geringes Angebot zum Kauf von LMBR1L-Antikörpern und andererseits keine Publikationen mit einem kommerziellen LMBR1L-Antikörper gibt. Jedoch sollte versucht werden, Protein- und Oberflächenexpression des LMBR1L an Genitalhautfibroblasten darzustellen. Der hierzu verwendete Antikörper (Tab. 28) zeigt mehrere Banden, wovon eine Bande etwas oberhalb von 40 kDa LMBR1L zugeordnet wurde (Abb. 15 A, Abb. 15 B, 3.10.7.4 - 3.10.7.6). Diese Zuordnung erfolgte aufgrund des Molekulargewichts von 40 kDa meines klonierten und HA-getaggten LMBR1L durch Nachweis mittels Anti-HA-Tag-Antikörper (Tab. 28, Abb. 12, Abb. 13) sowie der Beschreibung eines LMBR1L-Molekulargewichts in der SDS-Page von circa 40 kDa (Hesselink und Findlay, 2013) (3.10.7.4 - 3.10.7.6). Somit sind die Aussagen über LMBR1L-Protein- und Oberflächenexpression an Genitalhautfibroblasten als weniger verlässlich zu bewerten als die Ergebnisse des HAP1-Zellmodells mit eindeutig nachweisbarem HA-getaggten LMBR1L. Mittels Antikörper gegen LMBR1L (Tab. 28) ist nach Oberflächenbiotinylierung der Fibroblasten von DSD-Individuen und Kontrollen eine etwas oberhalb von 40 kDa liegende Bande nachweisbar (Abb. 15 B). Eine Western Blot Analyse der

Genitalhautfibroblasten zeigt neben dieser 40 kDa Bande der Oberflächenbiotinylierung eine Bande bei 55 kDa sowie eine Bande zwischen 40 kDa und 50 kDa (Abb. 15 A), beide sind im Eluat der Oberflächenbiotinylierung durch kürzere Expositionszeit nicht sichtbar (Abb. 15 B). Diese Banden könnten LMBR1L-Vorstufen entsprechen (55 kDa ist das aus der cDNA-Klonierung abgeleitete LMBR1L-Molekulargewicht (Wojnar et al., 2001)) oder unerwünschte Antikörperbindungen darstellen. Alle Aussagen zur LMBR1L-Protein- und Oberflächenexpression an Genitalhautfibroblasten enthalten die Unsicherheit, ob mittels des verwendeten Antikörpers tatsächlich ein LMBR1L-Nachweis erfolgt ist.

4.10.6 LMBR1L-Mutanten beeinträchtigen die Protein- und/oder Membranexpression

Nach transienter Transfektion zeigen die LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val im HAP1-*LMBR1L*-Knockout Zellmodell verglichen mit dem LMBR1L-Wildtyp eine signifikant verringerte Oberflächenexpression (Abb. 14). In HAP1-*LMBR1L*-Knockout-Zellen sollte der haploide Chromosomensatz (2.3.2.) genutzt werden, um den isolierten Effekt der jeweiligen *LMBR1L*-Mutation darzustellen. In einem diploiden Chromosomensatz könnte eine heterozygote *LMBR1L*-Mutation durch den *LMBR1L*-Wildtyp kompensiert werden. Umgekehrt wäre auch eine negative Beeinflussung von Allel/Genprodukt des *LMBR1L*-Wildtyps durch Allel/Genprodukt der *LMBR1L*-Mutante denkbar. Diese beiden beschriebenen Interaktionsmöglichkeiten zwischen *LMBR1L*-Wildtyp und der jeweiligen *LMBR1L*-Mutante p.Arg288Gln, p.Arg288Trp und p.Ile39Val können im haploiden HAP1-Zellmodell (2.3.2) nicht auftreten. Daher wurden Proteinexpression und Oberflächenexpression von LMBR1L-WT und LMBR1L-Mutanten auch an den diploiden Genitalhautfibroblasten analysiert. Die LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp sind bereits in der zellulären Membranproteinfraktion der Genitalhautfibroblasten signifikant reduziert nachweisbar (Abb. 15 A, 15 C, 15 D), sodass eine verringerte Proteinbildung der verminderten Membranexpression (Abb. 15 B) zugrunde liegt. Auch im HAP1-Zellmodell ist eine signifikant reduzierte Membranexpression der LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp nachgewiesen (Abb. 14 A - 14 D). Diese verringerte Membranexpression der LMBR1L-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp stellt den isolierten Effekt des jeweils zugrunde liegenden mutierten *LMBR1L*-Allels auf die LMBR1L-Proteinexpression dar. Anhand der LMBR1L-Expression der diploiden Genitalhautfibroblasten (Abb. 15) ist zusätzlich eine Interaktion des je-

weiligen mutierten *LMBR1L*-Allels/ -Genprodukts mit dem *LMBR1L*-Wildtyp-Allel/ -Genprodukt anzunehmen. Reduktionswerte um $\geq 50\%$ (Abb. 15) zeigen, dass keine Kompensation der *LMBR1L*/*LMBR1L*-Mutanten p.Arg288Gln und p.Arg288Trp durch den *LMBR1L*/*LMBR1L*-Wildtyp erfolgt. Stattdessen ist die mutationsbedingte Beeinträchtigung des *LMBR1L*-Wildtyp-Allels und/oder dessen Genprodukts durch die mutierten *LMBR1L*-Allele/deren Genprodukte eine mögliche Erklärung für die nachgewiesene Reduktion der *LMBR1L*-Expression von $\geq 50\%$ (Abb. 15). Die *LMBR1L*-Mutationen im Codon 288 (Tab. 32) könnten sich somit dominant-negativ ausprägen. Für *LMBR1L* ist die Möglichkeit einer Dimer-Bildung beschrieben (Hesselink und Findlay, 2013), sodass auch diese Dimerisierung/Dimerfunktion von *LMBR1L*-Mutationen betroffen sein könnte. Für die *LMBR1L*-Mutante p.Ile39Val zeigen mRNA-Level (Abb. 10 C) und Proteinexpression der Genitalhautfibroblasten (Abb. 15 A, Abb. 15 E) keine signifikanten Veränderungen im Vergleich mit Kontrollfibroblasten. Die jedoch verminderte Membranexpression der *LMBR1L*-Mutante p.Ile39Val (Abb. 15 B) könnte darauf hinweisen, dass eine Störung der Translokation in die Zellmembran vorliegt und somit der entscheidende Schritt von Membranlokalisation/ -einbau beeinträchtigt sein könnte (Braun und Schweizer, 2020). Dies wird durch die Analyse der isolierten Auswirkung von p.Ile39Val im HAP1-Zellmodell gestützt, da hiermit ebenfalls eine Beeinträchtigung der *LMBR1L*-Oberflächenexpression nachgewiesen ist (Abb. 14 A, 14 B, 14 E).

4.10.7 *LMBR1L*-Mutationen könnten die Sexualsteroid-Aufnahme beeinträchtigen

Zu den Lipocalinen gehört Apolipoprotein D (Flower, 1996), dessen Gen *APOD* in Genitalhautfibroblasten androgensensitiv ist (Appari et al., 2009). *APOD* könnte neben SHBG ein Binde-/ Transportprotein für Sexualsteroiden darstellen (Rassart et al., 2000). An *APOD* und/oder SHBG gebundene Sexualsteroiden könnten über *LMBR1L* mittels Endocytose (Fluckinger et al., 2008 und Hesselink und Findlay, 2013) in Zielzellen aufgenommen werden. Dieser mögliche Mechanismus ist in Abbildung 16 dargestellt. *LMBR1L*-Mutanten zeigen eine verminderte Membranexpression (Abb. 14, 15). Diese Reduktion der Transportproteine könnte eine endocytotische Transportkapazität verringern, zusätzlich wäre eine mutationsbedingte Beeinflussung der endocytotischen Funktion denkbar. Dieser mögliche Mechanismus ist in Abbildung 17 dargestellt. Zur Überprüfung dieses Transportmodells müsste eine zelluläre Aufnahme von Sexualsteroiden zwischen *LMBR1L*-

Mutanten und *LMBR1L*-Wildtyp verglichen werden. Durch eine defiziente Ligandenaufnahme wäre trotz im Körper vorhandener Sexualhormone und intaktem Rezeptor (AR) die intrazelluläre Androgenkonzentration reduziert und somit die androgenabhängigen Prozesse (Achermann und Hughes, 2011) beeinträchtigt (Abb. 17). In der biochemischen Charakterisierung des AR (1.8) zeigen alle *LMBR1L*-Fälle Auffälligkeiten (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 33). Fall 10 und Fall 6 zeigen einen qualitativen AR-Bindungsdefekt, Fall 11 zeigt einen quantitativen und qualitativen AR-Bindungsdefekt (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 33, Griffin, 1979 und Schönau et al., 1990 und 1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert). Bei allen drei Fällen ist die codierende *AR*-Sequenz unauffällig, hier können *AR*-Mutationen keine Ursache für einen AR-Bindungsdefekt darstellen. Somit sollte bezogen auf den AR-Liganden-Komplex eine Beeinträchtigung der Ligandenseite vorliegen. Die AR-Bindungsdefekte (1.8) wurden an intakten Genitalhautfibroblasten (Schweikert et al., 1989) nachgewiesen. Somit passen die AR-Bindungsdefekte der DSD-Fälle 6, 10 und 11 zu einer möglichen *LMBR1L*-vermittelten Sexualsteroidendocytose, die bei *LMBR1L*-Mutationen beeinträchtigt wäre. Bei reduzierter endocytotischer Hormonaufnahme über *LMBR1L*-Mutanten wäre in Zielzellen eine erniedrigte Testosteronkonzentration und somit eine verringerte DHT-Bildung zu erwarten. Diese verminderte intrazelluläre Hormonkonzentration würde zu beeinträchtigter Hormon-Androgenrezeptor-Bindung und somit zu den biochemisch beschriebenen AR-Bindungsdefekten (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 33, 1.8, ehemalige Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. H.-U. Schweikert) führen. Zudem würde eine defiziente Ligandenaufnahme trotz im Körper vorhandener Sexualhormone und intaktem Rezeptor (AR) durch die reduzierte intrazelluläre Androgenkonzentration die androgenabhängigen Prozesse (Achermann und Hughes, 2011) beeinträchtigen (Abb. 17). Hieraus könnte die Ausprägung von DSD-Charakteristika (Achermann und Hughes, 2011), wie sie bei den drei Individuen mit *LMBR1L*-Mutationen beschrieben sind (3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, Tab. 34), resultieren (Abb. 17).

4.10.8 DHT-Stimulation beeinflusst die *LMBR1L*-mRNA-Level

Für Kontrollfibroblasten ist eine physiologische intrazelluläre Hormonkonzentration und intakte androgenabhängige Genexpression anzunehmen. Eine Steigerung des zellulären Hormonspiegels - über eine mögliche *LMBR1L*-vermittelte Endocytose - ist somit nicht notwendig, eine DHT-Stimulation dieser Zellen hat keinen Einfluss auf die *LMBR1L*-

mRNA-Level (Abb. 11 A). Dies könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass sich in Kontrollzellen keine klare Abhängigkeit der *LMBR1L*-Expression von DHT zeigt (Abb. 11 A). Auch ist in Zellen mit *HSD17B3*-Mutationen keine Abhängigkeit der *LMBR1L*-Expression von DHT festzustellen (Abb. 11 B). Hierfür ist zudem zu berücksichtigen, dass differenzierte Genitalhautfibroblasten die Androgen-Responsivität der meisten Gene verlieren können und der Nachweis androgenabhängiger Gene für Genitalhautfibroblasten uneinheitlich sein kann (Appari et al., 2009 und Bebermeier et al., 2006 und Holterhus et al., 2003). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo*/im Laufe der Differenzierung der Genitalhautfibroblasten (Appari et al., 2009 und Bebermeier et al., 2006) bei den Zelllinien, die hier keine Reaktion auf DHT gezeigt haben, eine Stimulierbarkeit des *LMBR1L* durch Androgene möglich gewesen wäre. Bei Zelllinien mit *AR*-Mutationen resultieren aus DHT-Stimulation sowohl unveränderte als auch erhöhte *LMBR1L*-mRNA-Level (Abb. 11 C, Abb. 11 D). Die Induktion der *LMBR1L*-Genexpression bei einem Teil der Zelllinien mit *AR*-Mutation zeigt, dass die *LMBR1L*-Expression durch DHT stimulierbar ist. Neben einer möglichen Sexualsteroidendocytose (4.10.7) könnte somit ein weiterer Zusammenhang von *LMBR1L* und Sexualhormonstoffwechsel in einer durch DHT stimulierbaren Erhöhung der *LMBR1L*-mRNA liegen, die vermittelt über den AR abläuft. Hierfür kann die Hypothese gebildet werden, dass der AR als Ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor (Achermann und Hughes, 2011) an die *LMBR1L*-Promotorregion bindet. Die Steigerung der *LMBR1L*-Genexpression unter DHT-Stimulation könnte aus dem in Abbildung 16 dargestellten Mechanismus resultieren: Bei DHT-Stimulation wird das vermehrt vorhandene DHT endocytotisch durch hormonelle Zielzellen aufgenommen. Dort könnte DHT nach AR-Bindung die *LMBR1L*-Expression steigern, sodass über verstärkte *LMBR1L*-Bildung das erhöhte Hormonangebot durch *LMBR1L*-vermittelte Endocytose aufgenommen werden könnte. Bei den Zelllinien mit *AR*-Mutation, die ein gesteigertes *LMBR1L*-mRNA-Level zeigen (Abb. 11 D), soll möglicherweise durch endocytotische Erhöhung der intrazellulären Steroidhormonkonzentration die - durch eine *AR*-Mutation beeinträchtigte - AR-vermittelte Genexpression kompensiert werden. Somit könnte bei Mutationen in der LBD auf erhöhte intrazelluläre Ligandenkonzentration eine wahrscheinlichere Rezeptor-Liganden-Bindung folgen, die zu einer Kompensation der *AR*-Mutation beiträgt. Liegt die Mutation in der DBD des *AR*, könnte eine Steigerung der intrazellulären Ligandenkonzentration zu einer erhöhten Bildung von

Rezeptor-Liganden-Komplexen führen, wodurch möglicherweise die Rezeptor-DNA-Bindung und somit die über eine AR-Mutante vermittelte Genexpression gesteigert werden könnte. Dieser Mechanismus könnte erklären, dass eine der drei getesteten Zelllinien mit *AR*-Mutation in der DBD, die als Negativkontrollen dienen sollten, wider Erwarten eine Induktion der *LMBR1L*-Genexpression zeigt. Eine der drei *HSD17B3*-Zelllinien in Abbildung 11 B entspricht den Genitalhautfibroblasten von Fall 6. Bei der Kombination von Mutationen in *LMBR1L* und *HSD17B3* (3.7, 3.10.3, Tab. 32) hat eine Stimulation der Genitalhautfibroblasten mit DHT keinen Einfluss auf das *LMBR1L*-mRNA-Level (Abb. 11 B). Neben einer möglichen verminderten Testosteronproduktion (Andersson et al., 1996), (4.7.5) könnte zudem die endocytotische Hormonaufnahme *LMBR1L*-mutationsbedingt beeinträchtigt sein. Hier könnte für Fall 6 eine Verbindung der Mutationen in *HSD17B3* und *LMBR1L* liegen. Zum einen wäre möglicherweise die Testosteronproduktion (Schweizer et al., 2014 in Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie) durch den Enzymdefekt vermindert (Andersson et al., 1996), (4.7.5). Zum anderen könnte das restliche oder über alternative Synthesewege gebildete Testosteron (Andersson et al., 1996 und Auchus, 2004 und Boehmer et al., 1999) nur reduziert über mutierte *LMBR1L* in Zielzellen transportiert werden. Hierdurch wäre die Auswirkung dieser beiden zusammen vorliegenden Mutationen stärker als ihr alleiniges Vorkommen. Ein Vergleich der Phänotypen von Fall 10 und 11 mit Fall 6 zeigt, dass Fall 6 den am stärksten weiblich entwickelten Phänotyp bei männlichem Karyotyp aufweist (3.7, 3.10.1, 3.10.2, Tab. 34). Dies könnte durch die zusätzlichen Mutationen in *HSD17B3* und *ZFPM2* (3.7, Tab. 32) sowie deren möglicher Interaktion verursacht sein. Die *LMBR1L*-Mutation bei Fall 6 könnte somit durch kombinierte Wirkung der vorliegenden Mutationen zu einer oligogenen DSD-Entstehung (4.7.5) (Camats et al., 2020 und Kouri et al., 2021) beitragen.

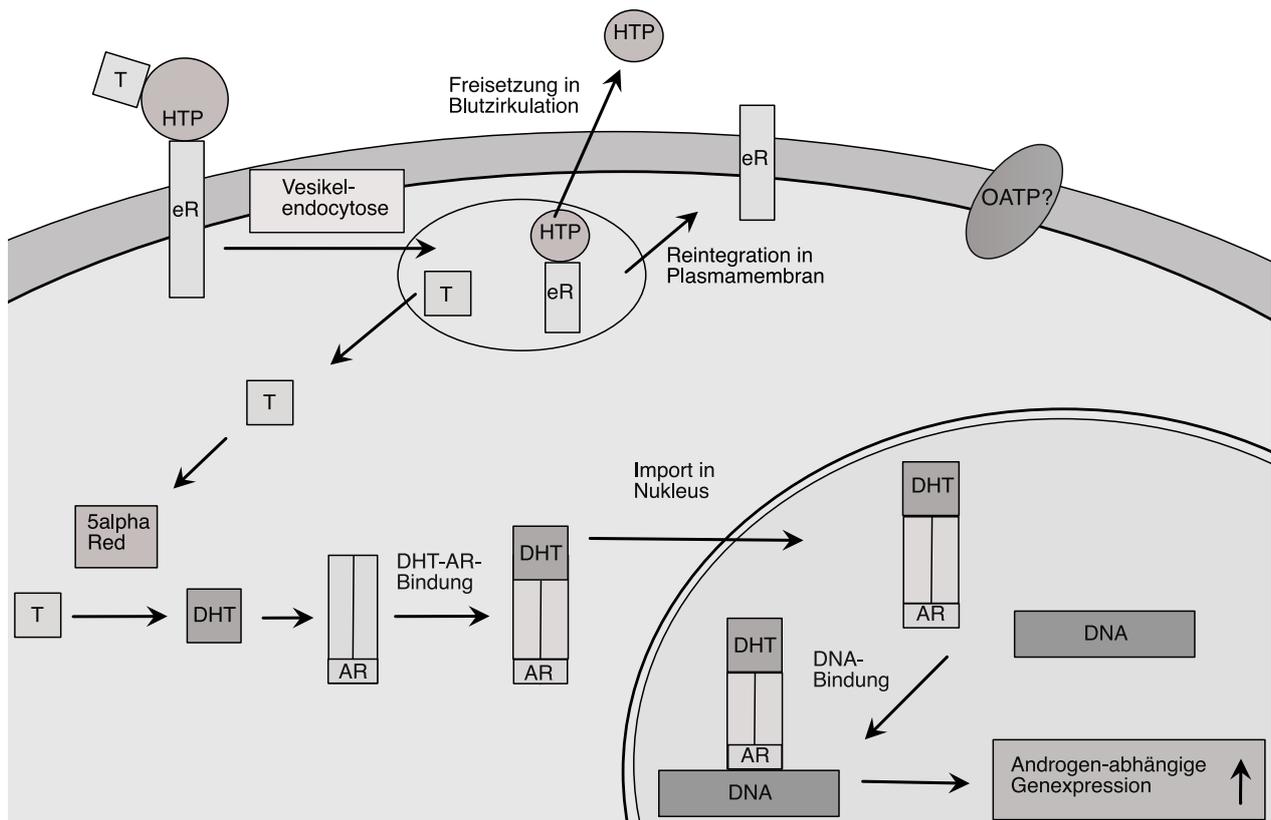


Abb. 16: Darstellung des in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus der zellulären Steroidhormonaufnahme über die endocytotischen Rezeptoren LRP2 (Chatelet et al., 1986) und LMBR1L (Wojnar et al., 2003) als möglicher Bestandteil der Geschlechtsentwicklung und des Sexualhormonstoffwechsels beim Menschen: Testosteron wird von einem Hormontransportprotein (SHBG (Hammes et al., 2005), möglicherweise APOD (Rassart et al., 2000)) gebunden und in der Blutzirkulation transportiert (Matsumoto und Bremner, 2011). Endocytotische Rezeptoren (LRP2, LMBR1L) in der Zellmembran von Zielzellen binden den Komplex aus Hormon und Hormontransportprotein. Dieser wird endocytotisch in die jeweilige Zielzelle aufgenommen. Aus dem endocytotischen Vesikel erfolgt die Freisetzung von Testosteron in das Cytoplasma, die Reintegration des Rezeptors in die Plasmamembran sowie die Freisetzung des Hormontransportproteins in die Blutzirkulation. (Abbildung/Beschreibung nach Christensen et al., 1999 und Griffin, 1992 und Hammes et al., 2005 und Nykjaer et al., 1999 und Willnow et al., 2007). Im Cytoplasma wird Testosteron durch das Enzym 5 α -Reduktase 2 zu DHT reduziert (Wilhelm und Koopman, 2006). DHT bindet an den AR, dieser wird als Dimer in den Nukleus transportiert (Achermann und Hughes, 2011). Hier erfolgt die Bindung an die DNA und die Regulation der androgenabhängigen Genexpression (Achermann und Hughes, 2011 und Hammes et al., 2005). OATP? symbolisiert ein Membrantransportprotein aus der Familie der organischen Anionentransporter, das analog zu Ecl in *Drosophila* (Okamoto et al., 2018) einen Steroidhormontransporter darstellen könnte, beim Menschen bisher jedoch nicht nachgewiesen worden ist (Schweizer et al., 2019). T: Testosteron. DHT: Dihydrotestosteron. AR: Androgenrezeptor. 5 α Red: 5 α -Reduktase 2. HTP: Hormontransportprotein: SHBG/APOD. eR: endocytotischer Rezeptor: LRP2/LMBR1L. OATP: organischer Anionentransporter. Nach Marko et al., 2022

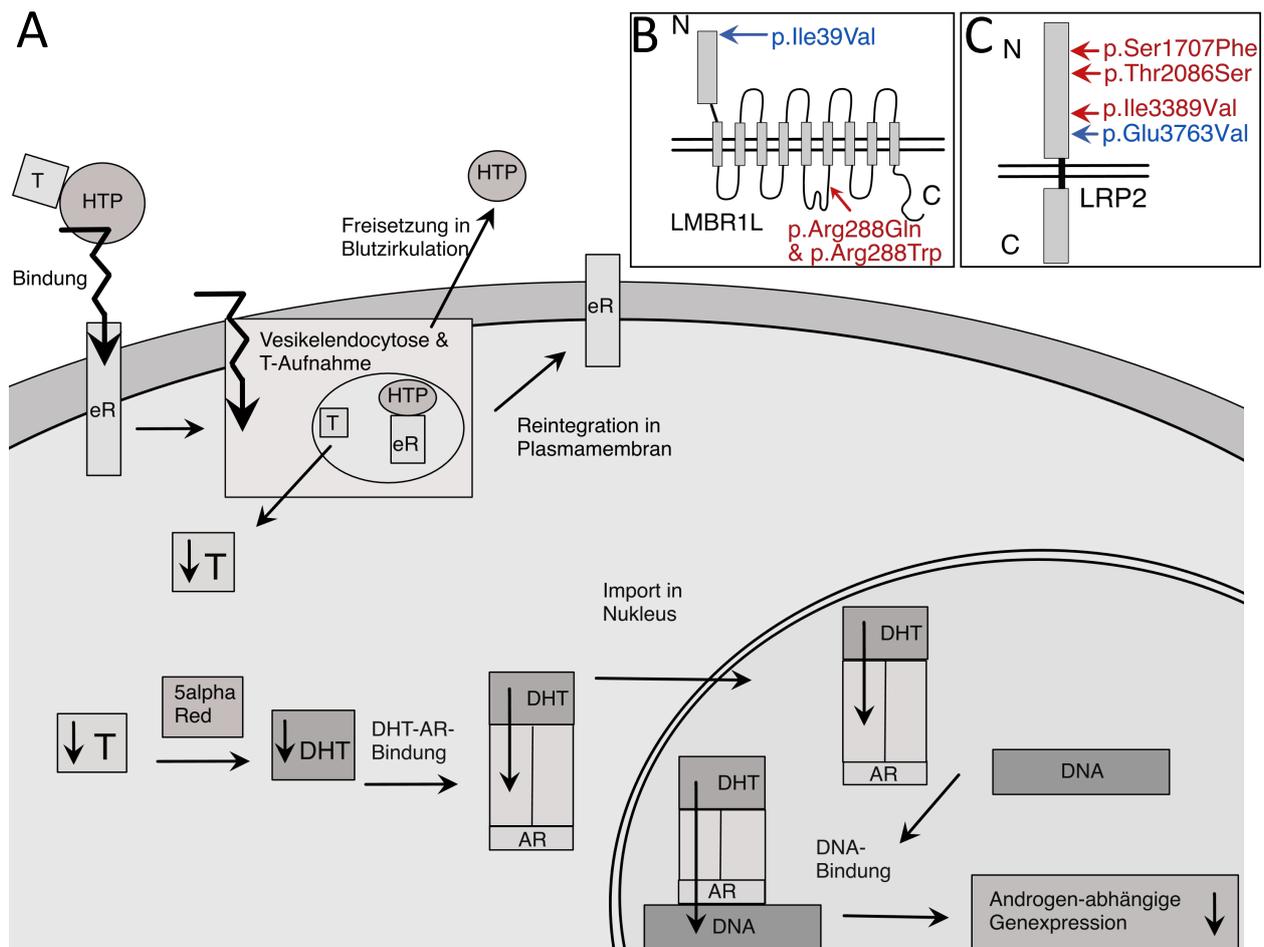


Abb. 17: Darstellung des in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus der DSD-Entstehung beim Menschen durch Beeinträchtigung einer möglichen zellulären Steroidhormonaufnahme über die endocytotischen Rezeptoren LPR2 (Chatelet et al., 1986) und LMBR1L (Wojnar et al., 2003): (A): Bei *LRP2/LMBR1L*-Mutation ist eine Beeinträchtigung des (möglichen) Endocytosemechanismus anzunehmen. Dies könnte die Bindung und/oder Aufnahme des Komplexes aus Hormon und Hormontransportprotein durch die Zielzellen einschränken. Durch eine beeinträchtigte endocytotische Testosteronaufnahme ist eine reduzierte intrazelluläre Testosteronkonzentration und nachfolgend eine verringerte DHT-Konzentration anzunehmen. Ist hierdurch die Bildung von AR-DHT-Komplexen vermindert, resultiert dies im Nukleus in einer Reduktion der androgenabhängigen Genexpression, die sich phänotypisch als DSD ausprägen kann (Achermann und Hughes, 2011), (Abb. A in Anlehnung an Griffin, 1992 und Willnow et al., 2007). T: Testosteron. DHT: Dihydrotestosteron. AR: Androgenrezeptor. 5α-Red: 5α-Reduktase 2. HTP: Hormontransportprotein (SHBG (Hammes et al., 2005), APOD (Rassart et al., 2000)). eR: endocytotischer Rezeptor: LRP2/LMBR1L. B+C: Darstellung der Mutationslokalisationen in LMBR1L (Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003) und LPR2 (Saito et al., 1994). (B): LMBR1L: Die bei Fall 10 (p.Arg288Gln) und 11 (p.Arg288Trp) nachgewiesenen Mutationen finden sich im cytoplasmatischen Anteil des Proteins LMBR1L, die bei Fall 6 nachgewiesene Mutation p.Ile39Val ist im extrazellulären Anteil des Proteins LMBR1L lokalisiert (Abb. B in Anlehnung an Wojnar et al., 2003). (C): LRP2: Die bei Fall 8 (p.Ser1707Phe, p.Thr2086Ser, p.Ile3389Val) und bei Fall 9 (p.Glu3763Val) nachge-

wiesenen Mutationen finden sich im extrazellulären Anteil des Proteins LRP2 (Abb. C in Anlehnung an Willnow et al., 1999). Nach Marko et al., 2022

4.11 *LRP2* und *LMBR1L* können neue Gene für DSD darstellen

Bei fünf bis dato ungeklärten DSD-Fällen (Individuen 6, 8, 9, 10, 11) sind in dieser Arbeit erstmalig Mutationen in den endocytotischen Rezeptorgenen *LRP2* (Megalin) und *LMBR1L* (Chatelet et al., 1986 und Wojnar et al., 2003) nachgewiesen worden (3.9, 3.10, Tab. 32). Zugleich liegen in den Exomen der Individuen 8, 9, 10, 11 keine Mutationen in bisher mit DSD assoziierten Genen (4.12) vor. Für Megalin ist eine endocytotische Aufnahme von SHBG mit hieran gebundenen Sexualsteroiden gezeigt (Hammes et al., 2005). Außerdem ist bekannt, dass 25-(OH) Vitamin D₃, ein Secosteroid, im Komplex mit seinem Transportprotein Vitamin D bindendes Protein (DBP) endocytotisch durch Megalin in Zellen aufgenommen wird (Nykjaer et al., 1999). Durch endocytotische Funktion und Ligandenzahl des *LMBR1L* wurde eine funktionelle Ähnlichkeit zu *LRP2* beschrieben (Fluckinger et al., 2008 und Hesselink und Findlay, 2013). Lipocalinrezeptor- und Lipocalinfunktion (Flower, 1996 und Fluckinger et al., 2008 und Hesselink und Findlay, 2013 und Rassart et al., 2000 und Wojnar et al., 2001 und Wojnar et al., 2003) lassen für *LMBR1L* eine mit *LRP2* vergleichbare, über APOD (Rassart et al., 2000) oder SHBG (Hammes et al., 2005) vermittelte, endocytotische Transportfunktion für Sexualsteroiden annehmen (Abb. 16). Je nach Organismus, Organ oder Entwicklungsstufe könnte eine zelluläre Steroidhormonaufnahme über verschiedene Bindungsproteine (SHBG (Hammes et al., 2005, APOD (Rassart et al., 2000)) vermittelt werden. Auch ein zellulärer Steroidtransport könnte über unterschiedliche Membranproteine (Schweizer et al., 2019) und somit sowohl vermittelt durch *LRP2* als auch durch *LMBR1L* ablaufen, was ebenfalls von Entwicklungsstufe (Hammes et al., 2005), Organ der Organismus abhängen könnte. Unterstützt wird die Hypothese, dass *LRP2* sowie *LMBR1L* einen Steroidtransportmechanismus darstellen könnten, durch Beschreibungen der zellulären Retinol (Vitamin A) -Aufnahme. Diese zeigen, dass eine Substanz, hier Retinol, gebunden an das Lipocalin Retinol bindendes Protein (RBP) (Flower, 1996) sowohl über Megalin (Christensen et al., 1999) als auch vermittelt durch STRA6 (Signaling Receptor And Transporter Of Retinol), einem Membranprotein mit Verbindung zur Lipocalinrezeptorfamilie (Chen et al., 2016 und Kawaguchi et al., 2007), aufgenommen werden kann. Die möglichen Hormonaufnahmewege über mehrere (endocytotische) Transportmechanismen und mit ver-

schiedenen möglichen Transportproteinen könnten spezifisch (Hammes et al., 2005 und Schweizer et al., 2019) für einzelne Zelltypen, Organe und Organismen und/oder spezifisch für Differenzierungsstufen (Hammes et al., 2005) eines Zelltyps, Organs oder eines Organismus sein. Zugleich könnten weitere Zellen, andere Differenzierungsstufen, die unterschiedlichen Organe/Strukturen eines Organismus sowie verschiedene Organismen einen anderen (endocytotischen) Mechanismus für Sexualsteroid aufweisen. Auch könnten mehrere Transportmechanismen zum gleichen Zeitpunkt in einem Zellsystem vorliegen, sodass bei Beeinträchtigung eines Aufnahmewegs (Teil-) Kompensationen über weitere Transportmechanismen möglich wären. Individuelle Unterschiede der Transporterexpressionen könnten zusätzlich zu unterschiedlichen Auswirkungen von Mutationen in an Transportprozessen beteiligten Genen führen. Insgesamt könnten hieraus variable Charakteristiken LRP2/LMBR1L-defizienter Strukturen und Organismen resultieren, ein Nebeneinander von intakten und defekten Sexualsteroid-abhängigen Funktionen/phänotypischen Ausprägungen möglich sein sowie unbeeinträchtigte Zellsysteme, Organe/Strukturen und Organismen begründet werden. Gegenüber der „freien Hormonhypothese“ und der „freien Hormontransporthypothese“ (Mendel, 1989 und Mendel, 1992 und Recant und Riggs, 1952) stellt Endocytose einen zielgerichteten Prozess (Robinson, 2015) für einen Steroidhormontransport (Hammes et al., 2005) dar. Für Schilddrüsenhormone ist beschrieben, dass die hormonelle Aktivität in Zielzellen unter anderem von der intrazellulären Hormonkonzentration und somit von Hormontransportern der Plasmamembran abhängt (Friesema et al., 2005). So könnten für Aktivität und Stoffwechsel der Sexualsteroid in Zielzellen eine vergleichbare Regulation (Schweizer et al., 2019) bis hin zur aktiven Kontrolle der intrazellulären Hormonkonzentration über Vorhandensein, Anzahl und Aktivität der Transmembrantransporter ermöglicht werden. In Steroidhormon-Zielzellen würde eine Regulation der (endocytotischen) Hormonaufnahme und somit der intrazellulären Hormonkonzentration Anpassungen an Hormonstoffwechsel, Hormonaktivität oder Hormonbedarf ermöglichen (3.10.6, 4.10.8). Phänotypisch zeigen die beschriebenen Individuen mit Mutationen in *LRP2/LMBR1L* PAIS-ähnliche Charakteristika (3.9, 3.10, Tab. 34), sodass eine reduzierte Stimulation der androgen-abhängigen Genexpression (Achermann und Hughes, 2011) vorgelegen haben muss. Hierzu passen die heterozygoten Mutationen in *LRP2* und *LMBR1L* (Abb. 6, Abb. 8, Abb. 17), die Proteinexpression und/oder Membranlokalisation vermindern (Abb. 7, Abb. 14,

Abb. 15). Folgt hieraus eine Beeinflussung der Endocytosekapazität und/oder -funktion, könnte dies zu einer verringerten intrazellulären Hormonkonzentration mit nachfolgend beeinträchtigter steroidhormonabhängiger Genexpression führen, woraus die Ausprägung von DSD-Charakteristiken (Achermann und Hughes, 2011) resultieren könnte. Dieser mögliche DSD-Entstehungsmechanismus ist in Abbildung 17 dargestellt. Anhand dieser Arbeit ist durch den Nachweis von Mutationen in endocytotischen Rezeptorgenen (*LRP2* (Chatelet et al., 1986) und *LMBR1L* (Wojnar et al., 2003)) bei Individuen, die DSD-Charakteristiken zeigen, zum ersten Mal eine Übertragung des endocytotischen Transportmechanismus von Sexualsteroiden aus Maus- und Zellmodell (Hammes et al., 2005) auf den Menschen möglich. Da eine Defizienz dieses Mechanismus bei Mäusen Aspekte einer beeinträchtigten Geschlechtsentwicklung zeigt (Hammes et al., 2005), lassen sich Mutationen in endocytotischen Rezeptoren mit einer DSD-Ausprägung beim Menschen in einen ursächlichen Zusammenhang bringen. Ich schlage die Erklärung vor, dass der DSD-Entstehung dieser fünf DSD-Individuen mit Mutationen in *LRP2* und *LMBR1L* ursächlich eine mutationsbedingt beeinträchtigte, *LRP2*-/*LMBR1L*-vermittelte, Sexualsteroidendocytose nach dem Modell in Abbildung 17 zugrunde liegen könnte.

4.12 Liste DSD-assoziiierter Gene

AKAP2, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C4, AMH, AMHR2, ANOS1, AR, ARX, ATF3, ATRX, BMP4, BMP7, BNC2, CBX2, CHD7, CUL4B, CYB5A, CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1, DAX1, DHCR7, DHH, DHX37, DMRT1, DMRT2, DUSP6, EMX2, ESR2, FGF17, FGF8, FGFR1, FGFR2, FLRT3, FSHR, GATA4, GHR, GLI2, GNRH1, GNRHR, HESX1, HHAT, HOXA13, HOXA4, HOXB6, HS6ST1, HSD17B3, HSD3B2, IL17RD, INSL3, KAL1, KISS1, KISS1R, LEP, LHB, LHCGR, LHFPL5, LHX3, LHX9, MAMLD1, MAP3K1, MID1, MYRF, NELF, NLGN4X, NMT2, NR0B1, NR5A1, POLR3A, POR, POU1F1, PROK2, PROKR2, PROP1, PSMC3IP, RSPO1, RXFP2, SEMA3A, SOX10, SOX2, SOX3, SOX8, SOX9, SPRY4, SRD5A2, SRY, STAR, STARD8, TAC3, TACR3, TDRD7, TSPYL1, TUBB3, WDR11, WNT4, WT1, WWOX, ZFPM2, ZNRF3 (Audi et al., 2018 und Baetens et al., 2019 und Buonocore et al., 2019 und Eggers et al., 2016 und Fan et al., 2017 und Hughes et al., 2019 und Xu et al., 2019).

5. Zusammenfassung

Differences of Sex Development (DSD) sind angeborene gonadal, chromosomal oder anatomisch atypische Entwicklungen der Geschlechtsorgane (Audi et al., 2018 und Hughes et al., 2006). Aus mehreren hundert DSD-Fällen wurden 16 Individuen ausgewählt und durch Exomsequenzierung analysiert. In sechs Fällen nachgewiesene Mutationen betreffen Gene, die mit der phänotypischen Ausprägung von DSD assoziiert sind. Zusätzlich wurde der erste 46,XY DSD-Fall mit Mutation in *KISS1* (Kisspeptin) charakterisiert. Ein neues Modell der DSD-Entstehung entstand durch fünf DSD-Exome mit Mutationen in Genen, die für endocytotische Transportproteine (Chatelet et al., 1986 und Wojnar et al., 2003) codieren: Zweimal liegen Mutationen im Megalin-Gen (*LRP2*) vor, dreimal finden sich Mutationen im Gen *LMBR1L* (Lipocalinrezeptor 1). Es ist bekannt, dass Steroide über LRP2 endocytiert werden (Nykjaer et al., 1999 und Hammes et al., 2005), dass *Lrp2*-Knockout-Mäuse DSD-ähnliche Auffälligkeiten zeigen (Hammes et al., 2005) und dass Lipocalinrezeptorliganden Steroide transportieren (Flower, 1996). Durch Analyse der *LRP2*-/*LMBR1L*-Mutationen auf DNA-/ mRNA-/ Proteinebene wurde ein Modell der DSD-Entstehung durch eine mögliche LRP2-/LMBR1L-vermittelte Sexualsteroid-Endocytose erstellt, die mutationsbedingt beeinträchtigt ist. Hierfür wurde gezeigt, dass die LRP2-Proteinexpression in Genitalhautfibroblasten der beiden DSD-Individuen um über 50 % reduziert ist. Für LMBR1L zeigen zwei Mutanten eine beeinträchtigte Transkription und reduzierte Proteinexpression, zudem sind alle drei LMBR1L-Mutanten in Genitalhautfibroblasten verringert in der Zellmembran vorhanden. *LMBR1L*-Wildtyp und Mutanten wurden kloniert und transfiziert, sodass mittels haploidem HAP1-*LMBR1L*-Knockout Zellmodell die Reduktion der LMBR1L-Mutanten in der Zellmembran bestätigt werden konnte. Bei Mutationen in *LRP2*/*LMBR1L* wäre die Beeinflussung einer möglichen Endocytoseaktivität für Steroidhormone anzunehmen. In Zielzellen würde dies zu verminderter intrazellulärer Androgenkonzentration, hierdurch reduzierter hormonabhängiger Genexpression und nachfolgender Beeinträchtigung der Geschlechtsentwicklung (Achermann und Hughes, 2011) führen. Das *Lrp2*-Knockout Mausmodell (Hammes et al., 2005) kann somit zum ersten Mal mit DSD-Individuen in einen Zusammenhang gebracht und verglichen werden. DSD-Fälle mit Mutationen in *LRP2* und *LMBR1L* werden in dieser Arbeit erstmalig auf eine mögliche beeinträchtigte Sexualsteroidendocytose zurückgeführt.

6. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Mutationen im <i>AR</i> : Fall 1: LBD und Fall 2: DBD	65
Abbildung 2: Mutation Fall 3: <i>MAP3K1</i> und Mutation Fall 4: <i>WWOX</i>	68
Abbildung 3: Mutationen in Fall 5: <i>MAMLD1</i> und <i>MAP3K1</i>	70
Abbildung 4: Mutationen in Fall 6: <i>HSD17B3</i> und <i>ZFPM2</i>	72
Abbildung 5: Mutation Fall 7: <i>KISS1</i> gDNA heterozygot und cDNA homozygot	74
Abbildung 6: Heterozygote Mutationen in <i>LRP2</i> : Fall 8 und Fall 9	77
Abbildung 7: <i>LRP2</i> -Mutationen reduzieren die <i>LRP2</i> -Proteinexpression in Genitalhautfibroblasten von Fall 8 und Fall 9	80
Abbildung 8: Nachweis heterozygoter <i>LMBR1L</i> -Mutationen in genomischer DNA der Genitalhautfibroblasten von Fall 6, 10 und 11	83
Abbildung 9: Nachweis heterozygoter <i>LMBR1L</i> -Mutationen in der cDNA von Genitalhautfibroblasten der Fälle 6, 10, 11	85
Abbildung 10: Vergleich der <i>LMBR1L</i> -mRNA-Expression in Genitalhautfibroblasten der Fälle 6, 10, 11 mit Kontrollfibroblasten	87
Abbildung 11: Vergleich der <i>LMBR1L</i> -mRNA-Level in Genitalhautfibroblasten ohne und mit DHT-Stimulation	89
Abbildung 12: Klonierung <i>LMBR1L</i> -Wildtyp und -Mutanten und Transfektion in HEK293-Zellen	91
Abbildung 13: Transfektion von <i>LMBR1L</i> -Wildtyp und -Mutanten in HAP1- <i>LMBR1L</i> -Knockout-Zellen	92

- Abbildung 14: *LMBR1L*-Mutationen führen zu verminderter Oberflächenexpression im HAP1-*LMBR1L*-Knockout Zellmodell 93
- Abbildung 15: *LMBR1L*-Mutationen vermindern Protein- und/oder Oberflächenexpression in Fibroblasten von DSD-Individuen 96
- Abbildung 16: Darstellung des in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus der zellulären Steroidhormonaufnahme über die endocytotischen Rezeptoren LPR2 und *LMBR1L* als möglicher Bestandteil der Geschlechtsentwicklung und des Sexualhormonstoffwechsels beim Menschen 133
- Abbildung 17: Darstellung des in dieser Arbeit vorgeschlagenen Mechanismus der DSD-Entstehung beim Menschen durch Beeinträchtigung einer möglichen zellulären Steroidhormonaufnahme über die endocytotischen Rezeptoren LPR2 und *LMBR1L* 134

7. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Verwendete Substanzen, Reagenziensysteme, Kits	34
Tabelle 2: Verwendete Geräte und Utensilien	35
Tabelle 3: Verwendete Datenbanken und Software	35
Tabelle 4: Zusammensetzung der Zellkulturmedien	37
Tabelle 5: Puffer und Lösungen zur gDNA Isolierung und gDNA/cDNA Sequenzierung	42
Tabelle 6: Sequenzierungsprimer genomische DNA	42
Tabelle 7: PCR-Programm zur Amplifikation genomischer DNA	43
Tabelle 8: cDNA-Synthese für Sequenzierungen	44
Tabelle 9: cDNA Sequenzierungsprimer	45
Tabelle 10: PCR zur Amplifikation von cDNA	45
Tabelle 11: Ansatz und Temperaturprogramm zur cDNA-Synthese für qRT-PCR	46
Tabelle 12: qRT-PCR: Ansatz und Temperaturprogramm	46
Tabelle 13: qRT-PCR-Primer	46
Tabelle 14: Klonierung <i>LMBR1L</i> : Puffer und Lösungen	47
Tabelle 15: Klonierungsprimer <i>LMBR1L</i>	48
Tabelle 16: Klonierungsreaktion <i>LMBR1L</i> aus HAP1-Zellen	48
Tabelle 17: Ansatz A-Tailing <i>LMBR1L</i> und Ligation <i>LMBR1L</i> mit pGEM [®] -T Easy	48

Tabelle 18:	Ansatz Kontrollverdau <i>LMBR1L</i> in pGEM®-T Easy	50
Tabelle 19:	Sequenzierungsprimer Klonierung <i>LMBR1L</i>	50
Tabelle 20:	Primer zum Anfügen des <i>HA</i> -Tags C-terminal und N-terminal an <i>LMBR1L</i>	51
Tabelle 21:	Klonierungsansatz und Temperaturprogramm: <i>HA</i> -Tag in pGEM®-T Easy	51
Tabelle 22:	Ansatz Kontrollverdau <i>LMBR1L HA</i> -Tag in pGEM®-T Easy	51
Tabelle 23:	Ansatz präparativer Verdau <i>HA-LMBR1L-/ LMBR1L-HA</i> -pGEM®-T Easy	52
Tabelle 24:	Ansatz Ligation <i>HA-LMBR1L/LMBR1L-HA</i> mit pcDNA3 und Kontrollverdau	52
Tabelle 25:	Mutageneseprimer <i>LMBR1L</i>	53
Tabelle 26:	QuikChange Lightning Klonierung der <i>LMBR1L</i> -Mutanten in pCDNA3	53
Tabelle 27:	Proteinbiochemische Methoden: Puffer und Lösungen	54
Tabelle 28:	Verwendete Primärantikörper mit RRID	55
Tabelle 29:	Verwendete Sekundärantikörper mit RRID	55
Tabelle 30:	Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamidgels	56
Tabelle 31:	Verwendete Proteinmengen für SDS-Page	57
Tabelle 32:	Übersicht über die nachgewiesenen Mutationen mit jeweiliger Genomkoordinate im Referenzgenom hg19, AIS- /AIS-ähnlichem Phänotyp und Allelfrequenzen	60
Tabelle 33:	Mutationsübersicht und biochemische Daten der zugehörigen Genitalhautfibroblasten	61

Tabelle 34:	Übersicht über die DSD-Fälle mit Biopsiestelle, Alter bei Biopsie, Grad der Virilisierung anhand der Sinnecker Skala (Sinnecker et al., 1997), Kurzbeschreibung des Phänotyps (CAIS-/ PAIS-ähnlich), basale und hCG-stimulierte Testosteronwerte	62
Tabelle 35:	<i>AR</i> -Mutationen von Fall 1 und Fall 2: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	66
Tabelle 36:	<i>MAP3K1</i> -Mutation von Fall 3: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	67
Tabelle 37:	<i>WWOX</i> -Mutation von Fall 4: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	68
Tabelle 38:	<i>MAMLD1</i> - und <i>MAP3K1</i> - Mutation von Fall 5: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	70
Tabelle 39:	<i>HSD17B3</i> - und <i>ZFPM2</i> -Mutation von Fall 6: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	72
Tabelle 40:	<i>KISS1</i> -Mutation von Fall 7: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	74
Tabelle 41:	<i>LRP2</i> -Mutationen Fall 8 und Fall 9: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	78
Tabelle 42:	<i>LMBR1L</i> -Mutationen von Fall 6, Fall 10, Fall 11: Vergleich der Pathogenitätsanalysen	84

8. Literaturverzeichnis

Achermann JC, Hughes IA. Disorders of sex development. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, Hrsg. Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011: 868-934

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods 2010; 7: 248-249

Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. Br Med Bull 2013; 106: 67-89

Ahmed SF, Dobbie R, Finlayson AR, Gilbert J, Youngson G, Chalmers J, Stone D. Prevalence of hypospadias and other genital anomalies among singleton births, 1988-1997, in Scotland. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2004; 89: F149-151

Anderson RGW, Goldstein JL, Brown MS. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. Nature 1977; 270: 695-699

Andersson AM, Toppari J, Haavisto AM, Petersen JH, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83: 675-681

Andersson S, Russell DW, Wilson JD. 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 3 Deficiency. Trends Endocrinol Metab 1996; 7: 121-126

Anzenberger U, Bit-Avragim N, Rohr S, Rudolph F, Dehmel B, Willnow TE, Abdelilah-Seyfried S. Elucidation of megalin/LRP2-dependent endocytic transport processes in the larval zebrafish pronephros. J Cell Sci 2006; 119: 2127-2137

Appari M, Werner R, Wunsch L, Cario G, Demeter J, Hiort O, Riepe F, Brooks JD, Holterhus PM. Apolipoprotein D (APOD) is a putative biomarker of androgen receptor function in androgen insensitivity syndrome. J Mol Med (Berl) 2009; 87: 623-632

Aqeilan RI, Hagan JP, de Bruin A, Rawahneh M, Salah Z, Gaudio E, Siddiqui H, Volinia S, Alder H, Lian JB, Stein GS, Croce CM. Targeted ablation of the WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor leads to impaired steroidogenesis. *Endocrinology* 2009; 150: 1530-1535

Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan JP, Zanesi N, Kaou M, Stein GS, Lian JB, Croce CM. Targeted deletion of *Wwox* reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 3949-3954

Auchus RJ. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 432-438

Audi L, Ahmed SF, Krone N, Cools M, McElreavey K, Holterhus PM, Greenfield A, Bashamboo A, Hiort O, Wudy SA, McGowan R, The EU Cost Action. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Approaches to molecular genetic diagnosis in the management of differences/disorders of sex development (DSD): position paper of EU COST Action BM 1303 'DSDnet'. *Eur J Endocrinol* 2018; 179: R197-R206

Audi L, Fernández-Cancio M, Carrascosa A, Andaluz P, Torán N, Piró C, Vilaró E, Vicens-Calvet E, Gussinyé M, Albisu MA, Yeste D, Clemente M, Hernández de la Calle I, Del Campo M, Vendrell T, Blanco A, Martínez-Mora J, Granada ML, Salinas I, Forn J, Calaf J, Angerri O, Martínez-Sopena MJ, del Valle J, García E, Gracia-Bouthelie R, Lapunzina P, Mayayo E, Labarta JI, Lledó G, Sánchez del Pozo J, Arroyo J, Pérez-Aytes A, Beneyto M, Segura A, Borrás V, Gabau E, Caimarí M, Rodríguez A, Martínez-Aedo MJ, Carrera M, Castaño L, Andrade M, Bermúdez de la Vega JA, GrApSIA. Novel (60%) and Recurrent (40%) Androgen Receptor Gene Mutations in a Series of 59 Patients with a 46,XY Disorder of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1876-1888

Baetens D, Verdin H, De Baere E, Cools M. Update on the genetics of differences of sex development (DSD). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019; 33: 101271

Bai S, He B, Wilson EM. Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1238-1257

Bakhaus K, Bennien J, Fietz D, Sanchez-Guijo A, Hartmann M, Serafini R, Love CC, Golovko A, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J. Sodium-dependent organic anion transporter (Slc10a6^{-/-}) knockout mice show normal spermatogenesis and reproduction, but elevated serum levels for cholesterol sulfate. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018; 179: 45-54

Baldazzi L, Nicoletti A, Gennari M, Barbaro M, Pirazzoli P, Cicognani A, Cacciari E. Two new point mutations of the SRY gene identified in two Italian 46,XY females with gonadal dysgenesis. *Clin Genet* 2003; 64: 258-260

Bashamboo A, Brauner R, Bignon-Topalovic J, Lortat-Jacob S, Karageorgou V, Lourenco D, Guffanti A, McElreavey K. Mutations in the FOG2/ZFPM2 gene are associated with anomalies of human testis determination. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 3657-3665

Bebermeier JH, Brooks JD, DePrimo SE, Werner R, Deppe U, Demeter J, Hiort O, Holterhus PM. Cell-line and tissue-specific signatures of androgen receptor-coregulator transcription. *J Mol Med (Berl)* 2006; 84: 919-931

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a Novel WW Domain-containing Protein Mapping to Human Chromosome 16q23.3–24.1, a Region Frequently Affected in Breast Cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 2140-2145

Berkovitz GD, Fechner PY, Marcantonio SM, Bland G, Stetten G, Goodfellow PN, Smith KD, Migeon CJ. The role of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in the etiology of 46,XX true hermaphroditism. *Hum Genet* 1992; 88: 411-416

Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348: 448-450

Bidlingmaier M, (a). GnRH-Test. In: Gressner AM, Arndt T, Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2019: 1011-1012

Bidlingmaier M, (b). HCG-Test. In: Gressner AM, Arndt T, Hrsg. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2019: 1078-1079

Birn H, Verroust PJ, Nexø E, Hager H, Jacobsen C, Christensen EI, Moestrup SK. Characterization of an epithelial approximately 460-kDa protein that facilitates endocytosis of intrinsic factor-vitamin B12 and binds receptor-associated protein. *J Biol Chem* 1997; 272: 26497-26504

Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Ørskov H, Willnow TE, Moestrup SK, Christensen EI. Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest* 2000; 105: 1353-1361

Boehmer ALM, Brinkmann AO, Nijman RM, Verleun-Mooijman MCT, de Ruiter P, Niermeijer MF, Drop SLS. Phenotypic variation in a family with partial androgen insensitivity syndrome explained by differences in 5 α dihydrotestosterone availability. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1240-1246

Boehmer ALM, Brinkmann AO, Sandkuijl LA, Halley DJJ, Niermeijer MF, Andersson S, de Jong FH, Kayserili H, de Vroede MA, Otten BJ, Rouwé CW, Mendonça BB, Rodrigues C, Bode HH, de Ruiter PE, Delemarre-van de Waal HA, Drop SLS. 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 4713-4721

Bouteille N, Driouch K, Hage PE, Sin S, Formstecher E, Camonis J, Lidereau R, Lallemand F. Inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene* 2009; 28: 2569-2580

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

Braun D, Schweizer U. The Protein Translocation Defect of MCT8(L291R) Is Rescued by Sodium Phenylbutyrate. *Eur Thyroid J* 2020; 9: 269-280

Brown MS, Goldstein JL. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell* 1976; 9: 663-674

Brown MS, Goldstein JL. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* 1975; 6: 307-316

Brown TR, Migeon CJ. Cultured human skin fibroblasts: a model for the study of androgen action. *Mol Cell Biochem* 1981; 36: 3-22

Buonocore F, Clifford-Mobley O, King TFJ, Striglioni N, Man E, Suntharalingham JP, Del Valle I, Lin L, Lagos CF, Rumsby G, Conway GS, Achermann JC. Next-Generation Sequencing Reveals Novel Genetic Variants (SRY, DMRT1, NR5A1, DHH, DHX37) in Adults With 46,XY DSD. *J Endocr Soc* 2019; 3: 2341-2360

Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P, Rossant J, McLaren A. Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX----XY chimaeric mouse testes. *Development* 1988; 102: 443-450

Camats N, Fernández-Cancio M, Audí L, Mullis PE, Moreno F, González Casado I, López-Siguero JP, Corripio R, Bermúdez de la Vega JA, Blanco JA, Flück CE. Human MAMLD1 Gene Variations Seem Not Sufficient to Explain a 46,XY DSD Phenotype. *PLoS One* 2015; 10: e0142831

Camats N, Fernández-Cancio M, Audí L, Schaller A, Flück CE. Broad phenotypes in heterozygous NR5A1 46,XY patients with a disorder of sex development: an oligogenic origin? *Eur J Hum Genet* 2018; 26: 1329-1338

Camats N, Fluck CE, Audi L. Oligogenic Origin of Differences of Sex Development in Humans. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1809

Chassaing N, Lacombe D, Carles D, Calvas P, Saura R, Bieth E. Donnai-Barrow syndrome: four additional patients. *Am J Med Genet* 2003; 121A: 258-262

Chatelet F, Brianti E, Ronco P, Roland J, Verroust P. Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli. I. Renal distribution. *Am J Pathol* 1986; 122: 500-511

Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1990; 265: 3116-3123

Chen Y, Clarke OB, Kim J, Stowe S, Kim YK, Assur Z, Cavalier M, Godoy-Ruiz R, von Alpen DC, Manzini C, Blaner WS, Frank J, Quadro L, Weber DJ, Shapiro L, Hendrickson WA, Mancina F. Structure of the STRA6 receptor for retinol uptake. *Science* 2016; 353: aad8266

Choi JH, Zhong X, McAlpine W, Liao TC, Zhang D, Fang B, Russell J, Ludwig S, Nair-Gill E, Zhang Z, Wang KW, Misawa T, Zhan X, Choi M, Wang T, Li X, Tang M, Sun Q, Yu L, Murray AR, Moresco EMY, Beutler B. LMBR1L regulates lymphopoiesis through Wnt/ β -catenin signaling. *Science* 2019; 364: aau0812

Christ A, Herzog K, Willnow TE. LRP2, an auxiliary receptor that controls sonic hedgehog signaling in development and disease. *Dev Dyn* 2016; 245: 569-579

Christ A, Christa A, Kur E, Lioubinski O, Bachmann S, Willnow TE, Hammes A. LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev Cell* 2012; 22: 268-278

Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, Blomhoff R, Willnow TE, Møstrup SK. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 685-695

Christensen HN, Hess B, Riggs TR. Concentration of taurine, β -alanine, and triiodothyronine by ascites carcinoma cells. *Cancer Res* 1954; 14: 124-127

Copeland KC, Chernausk S. Mini-Puberty and Growth. *Pediatrics* 2016; 138: e20161301

Craig EA, Stevens MV, Vaillancourt RR, Camenisch TD. MAP3Ks as central regulators of cell fate during development. *Dev Dyn* 2008; 237: 3102-3114

d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JPC, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MBL, Aparicio SAJR, Colledge WH.

Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10714-10719

de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 10972-10976

Deeb A, Mason C, Lee YS, Hughes IA. Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63: 56-62

Demirbilek H, Ozbek MN, Demir K, Kotan LD, Cesur Y, Dogan M, Temiz F, Mengen E, Gurbuz F, Yuksel B, Topaloglu AK. Normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a novel homozygous nonsense c.C969A (p.Y323X) mutation in the KISS1R gene in three unrelated families. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2015; 82: 429-438

Dhillon WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, McGowan BM, Amber V, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6609-6615

Donnai D, Barrow M. Diaphragmatic hernia, exomphalos, absent corpus callosum, hypertelorism, myopia, and sensorineural deafness: a newly recognized autosomal recessive disorder? *Am J Med Genet* 1993; 47: 679-682

Dumitrescu AM, Liao XH, Best TB, Brockmann K, Refetoff S. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 168-175

Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, Lambeth L, Bouty A, Knarston IM, Tan TY, Cameron F, Werther G, Hutson J, O'Connell M, Grover SR, Heloury Y, Zacharin M, Bergman P, Kimber C, Brown J, Webb N, Hunter MF, Srinivasan S, Titmuss A, Verge CF, Mowat D, Smith G, Smith J, Ewans L, Shalhoub C, Crock P, Cowell C, Leong GM, Ono M, Lafferty AR, Huynh T, Visser U, Choong CS, McKenzie F, Pachter N, Thompson EM, Couper J, Baxendale A, Gecz J, Wheeler BJ,

Jefferies C, MacKenzie K, Hofman P, Carter P, King RI, Krausz C, van Ravenswaaij-Arts CMA, Looijenga L, Drop S, Riedl S, Cools M, Dawson A, Juniarto AZ, Khadilkar V, Khadilkar A, Bhatia V, Dūng VC, Atta I, Raza J, Thi Diem Chi N, Hao TK, Harley V, Koopman P, Warne G, Faradz S, Oshlack A, Ayers KL, Sinclair AH. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol* 2016; 17: 243

Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res* 2012; 20: 215-238

Eid W, Biason-Lauber A. Why boys will be boys and girls will be girls: Human sex development and its defects. *Birth Defects Res C Embryo Today Rev* 2016; 108: 365-379

Fan Y, Zhang X, Wang L, Wang R, Huang Z, Sun Y, Yao R, Huang X, Ye J, Han L, Qiu W, Zhang H, Liang L, Gu X, Yu Y. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development. *Sci Rep* 2017; 7: 44536

Ferlin A, Vinanzi C, Garolla A, Selice R, Zuccarello D, Cazzadore C, Foresta C. Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 606-610

Fietz D, Bakhaus K, Wapelhorst B, Grosser G, Günther S, Alber J, Döring B, Kliesch S, Weidner W, Galuska CE, Hartmann MF, Wudy SA, Bergmann M, Geyer J. Membrane transporters for sulfated steroids in the human testis--cellular localization, expression pattern and functional analysis. *PLoS One* 2013; 8: e62638

Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318: 1-14

Flower DR. Multiple molecular recognition properties of the lipocalin protein family. *J Mol Recognit* 1995; 8: 185-195

Fluckinger M, Merschak P, Hermann M, Haertle T, Redl B. Lipocalin-interacting-membrane-receptor (LIMR) mediates cellular internalization of β -lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778: 342-347

Forest MG, Sizonenko PC, Cathiard AM, Bertrand J. Hypophyso-gonadal function in humans during the first year of life. 1. Evidence for testicular activity in early infancy. *J Clin Invest* 1974; 53: 819-828

Friesema ECH, Jansen J, Milici C, Visser TJ. Thyroid hormone transporters. *Vitam Horm* 2005; 70: 137-167

Friesema ECH, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 2003; 278: 40128-40135

Friesema ECH, Grueters A, Biebermann H, Krude H, von Moers A, Reeser M, Barrett TG, Mancilla EE, Svensson J, Kester MHA, Kuiper GGJM, Balkassmi S, Uitterlinden AG, Koehrle J, Rodien P, Halestrap AP, Visser TJ. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *The Lancet* 2004; 364: 1435-1437

Friesema ECH, Jansen J, Heuer H, Trajkovic M, Bauer K, Visser TJ. Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2: 512-523

Fujisawa Y, Fukami M, Hasegawa T, Uematsu A, Muroya K, Ogata T. Long-term clinical course in three patients with MAMLD1 mutations. *Endocr J* 2016; 63: 835-839

Fukami M, Wada Y, Miyabayashi K, Nishino I, Hasegawa T, Nordenskjöld A, Camerino G, Kretz C, Buj-Bello A, Laporte J, Yamada G, Morohashi K, Ogata T. CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat Genet* 2006; 38: 1369-1371

Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6)

transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J Biol Chem* 2008; 283: 5525-5532

Gallagher ED, Gutowski S, Sternweis PC, Cobb MH. RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 1872-1877

Galli-Tsinopoulou A, Serbis A, Kotanidou EP, Litou E, Dokousli V, Mouzaki K, Fanis P, Neocleous V, Skordis N. 46,XY Disorder of Sex Development due to 17-Beta Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Deficiency in an Infant of Greek Origin. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2018; 10: 74-78

Geyer J, Döring B, Meerkamp K, Ugele B, Bakhiya N, Fernandes CF, Godoy JR, Glatt H, Petzinger E. Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem* 2007; 282: 19728-19741

Geyer J, Godoy JR, Petzinger E. Identification of a sodium-dependent organic anion transporter from rat adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 300-306

Gianetti E, Seminara S. Kisspeptin and KISS1R: a critical pathway in the reproductive system. *Reproduction* 2008; 136: 295-301

Godovac-Zimmermann J. The structural motif of β -lactoglobulin and retinol-binding protein: a basic framework for binding and transport of small hydrophobic molecules? *Trends Biochem Sci* 1988; 13: 64-66

Goldstein JL, Dana SE, Brunschede GY, Brown MS. Genetic heterogeneity in familial hypercholesterolemia: evidence for two different mutations affecting functions of low-density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 1092-1096

Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutat* 2012; 33: 887-894

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74

Granados A, Alaniz VI, Mohnach L, Barseghyan H, Vilain E, Ostrer H, Quint EH, Chen M, Keegan CE. MAP3K1-related gonadal dysgenesis: Six new cases and review of the literature. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2017; 175: 253-259

Griffin JE. Androgen resistance - the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med* 1992; 326: 611-618

Griffin JE. Testicular feminization associated with a thermolabile androgen receptor in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 1979; 64: 1624-1631

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346: 245-250

Hammad SM, Barth JL, Knaak C, Argraves WS. Megalin acts in concert with cubilin to mediate endocytosis of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 12003-12008

Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, Raila J, Hubner N, Schulz H, Metzger J, Schweigert FJ, Lippa PB, Nykjaer A, Willnow TE. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005; 122: 751-762

Hannema SE, Scott IS, Hodapp J, Martin H, Coleman N, Schwabe JW, Hughes IA. Residual activity of mutant androgen receptors explains wolffian duct development in the complete androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5815-5822

Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin - Heidelberg: Springer, 2014

Hennemann G, Docter R, Friesema ECH, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 2001; 22: 451-476

Hesselink RW, Findlay JBC. Expression, characterization and ligand specificity of lipocalin-1 interacting membrane receptor (LIMR). *Mol Membr Biol* 2013; 30: 327-337

Hiort O, Sinnecker GHG, Holterhus P-M, Nitsche EM, Kruse K. The clinical and molecular spectrum of androgen insensitivity syndromes. *Am J Med Genet* 1996; 63: 218-222

Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD. Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biol* 2003; 4: R37

Hornig NC, Ukat M, Schweikert HU, Hiort O, Werner R, Drop SLS, Cools M, Hughes IA, Audi L, Ahmed SF, Demiri J, Rodens P, Worch L, Wehner G, Kulle AE, Dunstheimer D, Müller-Roßberg E, Reinehr T, Hadidi AT, Eckstein AK, van der Horst C, Seif C, Siebert R, Ammerpohl O, Holterhus PM. Identification of an AR Mutation-Negative Class of Androgen Insensitivity by Determining Endogenous AR Activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 4468-4477

Hryb DJ, Khan MS, Romas NA, Rosner W. The control of the interaction of sex hormone-binding globulin with its receptor by steroid hormones. *J Biol Chem* 1990; 265: 6048-6054

Hu LJ, Laporte J, Kress W, Kioschis P, Siebenhaar R, Poustka A, Fardeau M, Metzzenberg A, Janssen EA, Thomas N, Mandel JL, Dahl N. Deletions in Xq28 in two boys with myotubular myopathy and abnormal genital development define a new contiguous gene syndrome in a 430 kb region. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 139-143

Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet* 2012; 380: 1419-1428

Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, LWPES1 / ESPE2 Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child* 2006; 91: 554-563

Hughes LA, McKay-Bounford K, Webb EA, Dasani P, Clokie S, Chandran H, McCarthy L, Mohamed Z, Kirk JMW, Krone NP, Allen S, Cole TRP. Next generation sequencing (NGS) to improve the diagnosis and management of patients with disorders of sex development (DSD). *Endocr Connect* 2019; 8: 100-110

Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Cooper G, Danner R, Arthur A, Morris PL, Sweeney WJ, Shackleton C. Hormonal evaluation of a large kindred with complete androgen insensitivity: evidence for secondary 5 α -reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 931-941

Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 1990; 348: 452-454

Jawaheer D, Juo S-HH, Le Caignec C, David A, Petit C, Gregersen P, Dowbak S, Damle A, McElreavey K, Ostrer H. Mapping a gene for 46,XY gonadal dysgenesis by linkage analysis. *Clin Genet* 2003; 63: 530-535

Kalfa N, Fukami M, Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Weill J, Pinto G, Manouvrier S, Polak M, Ogata T, Sultan C. Screening of MAMLD1 mutations in 70 children with 46,XY DSD: identification and functional analysis of two new mutations. *PLoS One* 2012; 7: e32505

Kantarci S, Al-Gazali L, Hill RS, Donnai D, Black GCM, Bieth E, Chassaing N, Lacombe D, Devriendt K, Teebi A, Loscertales M, Robson C, Liu T, MacLaughlin DT, Noonan KM, Russell MK, Walsh CA, Donahoe PK, Pober BR. Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet* 2007; 39: 957-959

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 2007; 315: 820-825

Kerjaschki D, Farquhar MG. Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J Exp Med* 1983; 157: 667-686

Kim JH, Kang E, Heo SH, Kim GH, Jang JH, Cho EH, Lee BH, Yoo HW, Choi JH. Diagnostic yield of targeted gene panel sequencing to identify the genetic etiology of disorders of sex development. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 444: 19-25

Köhrle J, Schomburg L, Schweizer U. Hormone des Hypothalamus und der Hypophyse. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin - Heidelberg: Springer, 2014: 483-494

Kolesinska Z, Acierno Jr. J, Ahmed SF, Xu C, Kapczuk K, Skorczyk-Werner A, Mikos H, Rojek A, Massouras A, Krawczynski MR, Pitteloud N, Niedziela M. Integrating clinical and genetic approaches in the diagnosis of 46,XY disorder of sex development. *Endocr Connect* 2018; 7: 1480-1490

Konforte D, Shea JL, Kyriakopoulou L, Colantonio D, Cohen AH, Shaw J, Bailey D, Chan MK, Armbruster D, Adeli K. Complex biological pattern of fertility hormones in children and adolescents: a study of healthy children from the CALIPER cohort and establishment of pediatric reference intervals. *Clin Chem* 2013; 59: 1215-1227

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1991; 351: 117-121

Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276: 34631-34636

Kouri C, Sommer G, Fluck CE. Oligogenic Causes of Human Differences of Sex Development: Facing the Challenge of Genetic Complexity. *Horm Res Paediatr* 2021; 279-289

Krenning EP, Docter R, Bernard HF, Visser TJ, Hennemann G. Active transport of triiodothyronine (T3) into isolated rat liver cells. *FEBS Lett* 1978; 91: 113-116

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J. DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001; 22: 185-212

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685

Lanciotti L, Cofini M, Leonardi A, Penta L, Esposito S. Up-To-Date Review About Minipuberty and Overview on Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis Activation in Fetal and Neonatal Life. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018; 9: 410

Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 845-852

Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, Le WW, Hoffman GE, Seminara SB. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* 2007; 148: 4927-4936

Laporte J, Kioschis P, Hu LJ, Kretz C, Carlsson B, Poustka A, Mandel JL, Dahl N. Cloning and characterization of an alternatively spliced gene in proximal Xq28 deleted in two patients with intersexual genitalia and myotubular myopathy. *Genomics* 1997; 41: 458-462

Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Aucouturier P, Moskaug JØ, Otto A, Christensen EI, Willnow TE. Megalin Knockout Mice as an Animal Model of Low Molecular Weight Proteinuria. *Am J Pathol* 1999; 155: 1361-1370

Leshin M, Griffin JE, Wilson JD. Hereditary male pseudohermaphroditism associated with an unstable form of 5 α -reductase. *J Clin Invest* 1978; 62: 685-691

Levilliers J, Quack B, Weissenbach J, Petit C. Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XY females. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2296-2300

Li L, Su C, Fan L, Gao F, Liang X, Gong C. Clinical and molecular spectrum of 46,XY disorders of sex development that harbour MAMLD1 variations: case series and review of literature. *Orphanet J Rare Dis* 2020; 15: 188

Loke J, Pearlman A, Radi O, Zuffardi O, Giussani U, Pallotta R, Camerino G, Ostrer H. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 1073-1083

Lu JR, McKinsey TA, Xu H, Wang DZ, Richardson JA, Olson EN. FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4495-4502

Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2949-2955

Manuylov NL, Fujiwara Y, Adameyko II, Poulat F, Tevosian SG. The regulation of Sox9 gene expression by the GATA4/FOG2 transcriptional complex in dominant XX sex reversal mouse models. *Dev Biol* 2007; 307: 356-367

Marko HL, Hornig NC, Betz RC, Holterhus PM, Altmuller J, Thiele H, Fabiano M, Schweikert HU, Braun D, Schweizer U. Genomic variants reducing expression of two endocytic receptors in 46,XY differences of sex development. *Hum Mutat* 2022; 43: 420-433

Matsumoto AM, Bremner WJ. Testicular disorders. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, Hrsg. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011: 688-777

Melmed S, Kleinberg D, Ho K. Pituitary physiology and diagnostic evaluation. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, Hrsg. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2011: 175-228

Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989; 10: 232-274

Mendel CM. The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis. *J Androl* 1992; 13: 107-116

Miyado M, Fukami M, Ogata T. MAMLD1 and Differences/Disorders of Sex Development: An Update. *Sex Dev* 2021; 1-12

Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi KI, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T. Maml1 deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. *Endocrinology* 2012; 153: 6033-6040

Morohashi KI, Omura T. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J* 1996; 10: 1569-1577

Nakagome Y, Seki S, Fukutani K, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T. PCR detection of distal Yp sequences in an XX true hermaphrodite. *Am J Hum Genet* 1991; 41: 112-114

Nykjaer A, Dragun D, Walther D, Vorum H, Jacobsen C, Herz J, Melsen F, Christensen EI, Willnow TE. An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* 1999; 96: 507-515

Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 2002; 12: 273-280

O'Reilly MW, Kempegowda P, Jenkinson C, Taylor AE, Quanson JL, Storbeck KH, Arlt W. 11-Oxygenated C19 Steroids Are the Predominant Androgens in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2017; 102: 840-848

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Monteiro A, Cassie S, Bhattacharya S, Fowler PA. Developmental changes in human fetal testicular cell numbers and messenger ribonucleic acid levels during the second trimester. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 4792-4801

Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30: 713-743

Ogata T, Laporte J, Fukami M. MAMLD1 (CXorf6): a new gene involved in hypospadias. *Horm Res* 2009; 71: 245-252

Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene

KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411: 613-617

Okamoto N, Viswanatha R, Bittar R, Li Z, Haga-Yamanaka S, Perrimon N, Yamanaka N. A Membrane Transporter Is Required for Steroid Hormone Uptake in *Drosophila*. *Dev Cell* 2018; 47: 294-305

Orlando RA, Kerjaschki D, Kurihara H, Biemesderfer D, Farquhar MG. gp330 associates with a 44-kDa protein in the rat kidney to form the Heymann nephritis antigenic complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 6698-6702

Paccaud JP, Reith W, Johansson B, Magnusson KE, Mach B, Carpentier JL. Clathrin-coated pit-mediated receptor internalization. Role of internalization signals and receptor mobility. *J Biol Chem* 1993; 268: 23191-23196

Pakarainen T, Zhang FP, Mäkelä S, Poutanen M, Huhtaniemi I. Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology* 2005; 146: 596-606

Pasqualini JR, Chetrite GS. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 93: 221-236

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb M. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183

Petersen HH, Hilpert J, Militz D, Zandler V, Jacobsen C, Roebroek AJM, Willnow TE. Functional interaction of megalin with the megalinbinding protein (MegBP), a novel tetratricopeptide repeat-containing adaptor molecule. *J Cell Sci* 2003; 116: 453-461

Petrovski S, Wang Q, Heinzen EL, Allen AS, Goldstein DB. Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003709

Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin-Villemant C, O'Connor MB. Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the

hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13773-13778

Qin Y, Bishop CE. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1221-1229

Rao GS. Mode of entry of steroid and thyroid hormones into cells. *Mol Cell Endocrinol* 1981; 21: 97-108

Rao GS, Eckel J, Rao ML, Breuer H. Uptake of thyroid hormone by isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 73: 98-104

Rao ML, Rao GS, Eckel J, Breuer H. Factors involved in the uptake of corticosterone by rat liver cells. *Biochim Biophys Acta* 1977; 500: 322-332

Rao ML, Rao GS, Höller M, Breuer H, Schattenberg PJ, Stein WD. Uptake of cortisol by isolated rat liver cells. A phenomenon indicative of carrier-mediation and simple diffusion. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 1976; 357: 573-584

Rassart E, Bedirian A, Do Carmo S, Guinard O, Sirois J, Terrisse L, Milne R. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1482: 185-198

Ray LB, Sturgill TW. Characterization of Insulin-stimulated Microtubule-associated Protein Kinase. *J Biol Chem* 1988; 263: 12721-12727

Recant L, Riggs DS. Thyroid function in nephrosis. *J Clin Invest* 1952; 31: 789-797

Rege J, Garber S, Conley AJ, Elsey RM, Turcu AF, Auchus RJ, Rainey WE. Circulating 11-oxygenated androgens across species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2019; 190: 242-249

Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, Honma S, Sasano H, Rainey WE. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein 19-carbon steroids before and after ACTH stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 1182-1188

Rege J, Turcu AF, Kasa-Vubu JZ, Lerario AM, Auchus GC, Auchus RJ, Smith JM, White PC, Rainey WE. 11-Ketotestosterone Is the Dominant Circulating Bioactive Androgen During Normal and Premature Adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103: 4589-4598

Reva B, Antipin Y, Sander C. Determinants of protein function revealed by combinatorial entropy optimization. *Genome Biol* 2007; 8: R232

Rewitz KF, Rybczynski R, Warren JT, Gilbert LI. The Halloween genes code for cytochrome P450 enzymes mediating synthesis of the insect moulting hormone. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 1256-1260

Robinson MS. Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* 2015; 16: 1210-1238

Sadler TW. *Taschenlehrbuch Embryologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2014

Saif MW, Chu E. Biology of colorectal cancer. *Cancer J* 2010; 16: 196-201

Saito A, Pietromonaco S, Loo AKC, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330: "megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 9725-9729

Scatchard G. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann N Y Acad Sci* 1949; 51: 660-672

Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2013

Schönau E, Pfeiffer RA, Schweikert HU, Böwing B, Schott G. Robinow or "fetal face syndrome" in a male infant with ambiguous genitalia and androgen receptor deficiency. *Eur J Pediatr* 1990; 149: 615-617

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 2014; 11: 361-362

Schweikert HU. The androgen resistancesyndromes: clinical and biochemical aspect. *Eur J Pediatr* 1993; 152: S50-S57

Schweikert HU, Schlüter M, Romalo G. Intracellular and nuclear binding of [3H]dihydrotestosterone in cultured genital skin fibroblasts of patients with severe hypospadias. *J Clin Invest* 1989; 83: 662-668

Schweizer U, Braun D, Forrest D. The Ins and Outs of Steroid Hormone Transport Across the Plasma Membrane: Insight From an Insect. *Endocrinology* 2019; 160: 339-340

Schweizer U, Schomburg L, Köhrle J. Steroidhormone - Produkte von Nebennierenrinde und Keimdrüsen. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Hrsg. Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2014: 495-511

Segditsas S, Tomlinson I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 2006; 25: 7531-7537

Selcer KW, Kabler H, Sarap J, Xiao Z, Li PK. Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCaP human prostate cancer cells. *Steroids* 2002; 67: 821-826

Seminara SB, Crowley Jr WF. Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 727-731

Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MBL, Crowley Jr WF, Aparicio SAJR, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003; 349: 1614-1627

Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, Aparicio SA. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 1849-1855

Shihab HA, Gough J, Cooper DN, Stenson PD, Barker GLA, Edwards KJ, Day INM, Gaunt TR. Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models. *Hum Mutat* 2013; 34: 57-65

Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region

encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346: 240-244

Sinnecker GHG, Hiort O, Nitsche EM, Holterhus PM, Kruse K. 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* 1997; 156: 7-14

Sousa MM, Norden AGW, Jacobsen C, Willnow TE, Christensen EI, Thakker RV, Verroust PJ, Moestrup SK, Saraiva MJ. Evidence for the role of megalin in renal uptake of transthyretin. *J Biol Chem* 2000; 275: 38176-38181

Stein R, Thüroff JW. Lageanomalien des Hodens. In: Hautmann R, Gschwend JE, Hrsg. *Urologie*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2014: 415-420

Strott CA. Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 2002; 23: 703-732

Tata JR. How specific are "nuclear" receptors for thyroid hormones? *Nature* 1975; 257: 18-23

Tena-Sempere M. Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology* 2005; 146: 3683-3685

Tevosian SG, Albrecht KH, Crispino JD, Fujiwara Y, Eicher EM, Orkin SH. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 2002; 129: 4627-4634

Thummel CS. Flies on steroids - *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* 1996; 12: 306-310

Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, Gurbuz F, Temiz F, Millar RP, Yuksel B. Inactivating KISS1 Mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012; 366: 629-635

Turcu AF, Nanba AT, Chomic R, Upadhyay SK, Giordano TJ, Shields JJ, Merke DP, Rainey WE, Auchus RJ. Adrenal-derived 11-oxygenated 19-carbon steroids are the dominant androgens in classic 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol* 2016; 174: 601-609

Ugele B, Simon S. Uptake of dehydroepiandrosterone-3-sulfate by isolated trophoblasts from human term placenta, JEG-3, BeWo, Jar, BHK cells, and BHK cells transfected with human steryl sulfatase-cDNA. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 71: 203-211

Vaser R, Adusumalli S, Leng SN, Sikic M, Ng PC. SIFT missense predictions for genomes. *Nat Protoc* 2016; 11: 1-9

Visser WE, Friesema ECH, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1-14

Weidemann W, Linck B, Haupt H, Mentrup B, Romalo G, Stockklauser K, Brinkmann AO, Schweikert HU, Spindler KD. Clinical and biochemical investigations and molecular analysis of subjects with mutations in the androgen receptor gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 45: 733-739

White S, Hewitt J, Turbitt E, van der Zwan Y, Hersmus R, Drop S, Koopman P, Harley V, Cools M, Looijenga L, Sinclair A. A multi-exon deletion within WWOX is associated with a 46,XY disorder of sex development. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 348-351

Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 620-631

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 2007; 87: 1-28

Willnow TE, Goldstein JL, Orth K, Brown MS, Herz J. Low density lipoprotein receptor-related protein and gp330 bind similar ligands, including plasminogen activator-inhibitor complexes and lactoferrin, an inhibitor of chylomicron remnant clearance. *J Biol Chem* 1992; 267: 26172-26180

Willnow TE, Nykjaer A, Herz J. Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1999; 1: 157-162

Willnow TE, Hammes A, Eaton S. Lipoproteins and their receptors in embryonic development: more than cholesterol clearance. *Development* 2007; 134: 3239-3249

Wilson JD. Dihydrotestosterone formation in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 1975; 250: 3498-3504

Wojnar P, Lechner M, Merschak P, Redl B. Molecular cloning of a novel lipocalin-1 interacting human cell membrane receptor using phage display. *J Biol Chem* 2001; 276: 20206-20212

Wojnar P, Lechner M, Redl B. Antisense down-regulation of lipocalin-interacting membrane receptor expression inhibits cellular internalization of lipocalin-1 in human NT2 cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 16209-16215

Xu Y, Wang Y, Li N, Yao R, Li G, Li J, Ding Y, Chen Y, Huang X, Chen Y, Qing Y, Yu T, Shen Y, Wang X, Shen Y, Wang J. New insights from unbiased panel and whole-exome sequencing in a large Chinese cohort with disorders of sex development. *Eur J Endocrinol* 2019; 181: 311-323

Yamanaka N, Marqués G, O'Connor MB. Vesicle-Mediated Steroid Hormone Secretion in *Drosophila melanogaster*. *Cell* 2015; 163: 907-919

Yamanaka N, Rewitz KF, O'Connor MB. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annu Rev Entomol* 2013; 58: 497-516

Yang X, Coulombe-Huntington J, Kang S, Sheynkman GM, Hao T, Richardson A, Sun S, Yang F, Shen YA, Murray RR, Spirohn K, Begg BE, Duran-Frigola M, MacWilliams A, Pevzner SJ, Zhong Q, Trigg SA, Tam S, Ghamsari L, Sahni N, Yi S, Rodriguez MD, Balcha D, Tan G, Costanzo M, Andrews B, Boone C, Zhou XJ, Salehi-Ashtiani K, Charloteaux B, Chen AA, Calderwood MA, Aloy P, Roth FP, Hill DE, Iakoucheva LM, Xia Y, Vidal M. Widespread Expansion of Protein Interaction Capabilities by Alternative Splicing. *Cell* 2016; 164: 805-817

Yuan SM, Zhang YN, Du J, Li W, Tu CF, Meng LL, Lin G, Lu GX, Tan YQ. Phenotypic and molecular characteristics of androgen insensitivity syndrome patients. *Asian J Androl* 2018; 20: 473-478

Zeng C, Spielman AI, Vowels BR, Leyden JJ, Biemann K, Preti G. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6626-6630

Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, McCluskey RT. Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 531-542

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Schweizer für ein spannendes und vielseitiges Themengebiet, das ich für meine Doktorarbeit bearbeiten konnte. Während der gesamten Zeit blieb es ein interessantes und abwechslungsreiches Projekt. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Doreen Braun dafür, dass sie mir die notwendigen Labormethoden beigebracht hat, um dieses Projekt umzusetzen sowie für das erste Korrekturlesen meiner Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Prof. Dr. med. Hans-Udo Schweikert für die Möglichkeit, mit dem Material zu arbeiten, das er über sein gesamtes Berufsleben hinweg gesammelt hat und das ich nun als Grundlage für meine Arbeit verwenden konnte. Außerdem besten Dank an Frau Dr. rer. nat. Nadine Hornig für Einblicke in ihre Forschungsarbeiten und die Bereitstellung von Ergebnissen ihres APOD Assay sowie an Herrn Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus für seine Mitarbeit und Hilfe im Rahmen der zu dieser Arbeit gehörenden Publikation. Zudem herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. med. Regina Betz für ihre Hilfe am Anfang des Arbeitens mit varbank. Bei der gesamten AG Schweizer bedanke ich mich zusätzlich für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei Fragen und Unklarheiten, wofür immer jemand zum Mitüberlegen und Weiterhelfen da war.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Publikation

Marko HL, Hornig NC, Betz RC, Holterhus PM, Altmüller J, Thiele H, Fabiano M, Schweikert HU, Braun D, Schweizer U. Genomic variants reducing expression of two endocytic receptors in 46,XY differences of sex development. *Hum Mutat* 2022; 43: 420-433, DOI: 10.1002/humu.24325

Die Publikation wurde anhand dieser Dissertationsschrift verfasst, Inhalte dieser Arbeit finden sich somit auch in der Publikation. Die Autorin der Dissertationsschrift ist die Erstautorin der genannten Publikation.

Vortrag

Marko HL, Hornig NC, Betz RC, Holterhus PM, Altmüller J, Thiele H, Schweikert HU, Braun D, Schweizer U.

Neue Genmutationen in 46,XY DSD: *KISS1* und die endocytotischen Rezeptoren *LRP2* und *LMBR1L*.

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Berlin/virtuell, 3. bis 5. März 2021

Posterpräsentation

Marko HL, Hornig NC, Betz RC, Holterhus PM, Altmüller J, Thiele H, Schweikert HU, Braun D, Schweizer U.

Neue Genmutationen in 46,XY DSD: *KISS1* und die endocytotischen Rezeptoren *LRP2* und *LMBR1L*.

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Berlin/virtuell, 3. bis 5. März 2021

Preis

Posterpreis, Deutsche Gesellschaft für Endokrinologie (Sponsor: Pfizer)

Kongress der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Berlin/virtuell, 3. bis 5. März 2021

Stipendien

Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes (02/2017 – 05/2021)

BONFOR SciMed Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn
(04/2018 – 03/2019)