

Aus dem Departement für Frauengesundheit Tübingen
Forschungsinstitut für Frauengesundheit

Mutationsanalyse von OXTR und ESR1
bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Frank, Liliane Theresa

2017

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Brucker

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Zender

Tag der Disputation: 22. 02. 2017

Meinen Eltern und meinen beiden Schwestern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Ätiologie und Definition des MRKH-Syndroms	1
1.2	Embryologie und Grundlagen des MRKH-Syndroms	3
1.3	Geschichtlicher Abriss.....	9
1.4	Diagnostik des MRKH-Syndroms.....	10
1.5	Forschungsergebnisse zur Ätiologie des MRKH-Syndroms	11
1.6	Erläuterung verschiedener Begrifflichkeiten als Vorgriff auf den Ergebnis- bzw. Diskussionsteil	15
1.6.1	Bedeutung posttranskriptioneller Veränderungen.....	15
1.6.2	miRNA.....	18
1.6.2.1	Biogenese und Funktion der miRNA	18
1.6.2.2	Bedeutung von miRNAs bezogen auf das MRKH-Syndrom.	19
1.6.3	Internationales HapMap-Projekt	20
1.7	Kontext der vorliegenden Arbeit und Fragestellung.....	21
1.7.1	Wegweisende Vorbefunde.....	21
1.7.2	Konkrete Fragestellung dieser Dissertation	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Primer	24
2.2	Größenstandard für die gelelektrophoretische Analyse	24
2.3	vorgefertigte Reaktionslösungen.....	25
2.4	Enzyme.....	25
2.5	Chemikalien	25
2.6	Puffer	26
2.7	Geräte.....	26
2.8	Verbrauchsmaterialien	27
2.9	Software und Internetressourcen	28
2.10	Methoden.....	29
2.10.1	Patientenkollektiv/ Untersuchungsmaterial	29
2.10.2	DNA-Isolation – Roboter.....	30
2.10.3	DNA-Isolation – manuell.....	30
2.10.4	Polymerasekettenreaktion (PCR) ⁶⁶	31
2.10.5	Gelelektrophorese	33

2.10.6	Exonuklease I/ antarktische Phosphataseverdau der PCR-Amplifikate	33
2.10.7	Sequenzierreaktion	34
2.10.8	Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion	35
2.10.9	vollautomatische Sequenzierung mittels CEQ 8000	35
2.10.10	Abgleich gefundener Sequenzveränderungen mit bestehenden Datenbanken.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Ergebnisse von DNA-Isolation, PCR und Sequenzierung	37
3.2	Ergebnisse der Sequenzanalyse des Gens für den Oxytozinrezeptor (OXTR; NM_000916.3 ⁶³).....	39
3.2.1	Kurze Darstellung möglicherweise pathogener Basensubstitutionen im Gen OXTR (NM_000916.3 ⁶³).....	51
3.3	Ergebnisse der Sequenzanalyse des Gen für den Östrogenrezeptor α (ESR1; NM_0011227421 ⁶³).....	52
3.3.1	Übersicht über näher untersuchte Sequenzveränderungen im Gen ESR1 (NM_0011227421 ⁶³).....	62
4	Diskussion.....	67
4.1	Anmerkungen zu den angewandten Methoden	67
4.2	Interpretation der Ergebnisse	71
4.2.1	Bedeutung der im Gen OXTR (NM_000916 ⁶³) detektierten Sequenzveränderungen c.-551C>T (rs2301260 ⁷³), c.-133A>C und c.712G>A (rs61740241 ⁷³).....	71
4.2.2	Bedeutung der im Gen ESR1 (NM_0011227421 ⁶³) detektierten Sequenzveränderungen	73
4.2.2.1	c.805C>T (rs142712646 ⁷³) - Polymorphismus mit direkter Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.....	74
4.2.2.2	c.720C>T (rs200303616 ⁷³) - Punktmutation mit Auswirkung auf den Spleißprozess	76
4.2.2.3	c.*96C>T (rs9341070 ⁷³) - Alteration einer miRNA- Bindungsstelle	78
5	Zusammenfassung/ Ausblick	82
6	Anhang	84
6.1	Anonymisierte Liste an der Studie beteiligter MRKH-Patientinnen	84
6.2	Liste verwendeter Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR).....	85
6.2.1	Gen für den Oxytozinrezeptor (OXTR) ⁶⁴	85

6.2.2	Gen für den Östrogenrezeptor α (ESR1) ⁶⁴	85
7	Abbildungsverzeichnis	86
8	Tabellenverzeichnis	87
9	Literaturverzeichnis	88
10	Erklärung zum Eigenanteil	94
11	Danksagung	95

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AFS	American Fertility Society
AMH	Anti-Müller-Hormon
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Humain
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
CNV	Copy Number Variation
DES	Diethylstilbestrol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER α / β	Östrogenrezeptor α / β
ERE	Östrogen-responsives Element
ESGE	European Society for Gynaecological Endoscopy
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
ESP	Exome Sequencing Project
<i>et al.</i>	und andere
EW	Embryonalwoche
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
G	Guanin
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobasen
LH	Luteinisierendes Hormon
MAF	Minor Allel Frequency
MgCl ₂ ,	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)

miRNA	micro Ribonukleinsäure
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRKH-Syndrom	Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MURCS	Mullerian Duct Aplasia, Unilateral Renal Agenesis and Cervicothoracic Somite Anomalies
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nsSNP	nicht-synonymer Single Nucleotide Polymorphism
OT-R	Oxytozinrezeptor
Pos.	Position
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
RISC	RNA-induced-silencing-complex
s	Sekunde(n)
SLS	Sample Loading Solution
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein Particle
SRY	Sex determining region on the Y
T	Thymin
TDF	Testis-determinierender Faktor
U	Einheit(en)
UTR	Untranslated Region
UV-Licht	ultraviolettes Licht
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

1.1 Ätiologie und Definition des MRKH-Syndroms

15% der jungen Frauen, die wegen primärer Amenorrhoe beim Haus- oder Facharzt vorstellig werden, zeigen Auffälligkeiten bzw. Anomalien bei Untersuchung der Genitalien.¹ Dabei stehen Fehlbildungen der Müllergänge bezüglich der Häufigkeit des Auftretens an zweiter Stelle.² Hierzu zählt ein breites Spektrum genitaler Malformationen, die auf einer Störung der Fusion bzw. Resorption vorhandener Septierungen der paarig angelegten Müllergänge während der Embryonalentwicklung beruhen: Neben doppelt angelegten Uteri (*Uterus bicornis*, *Uterus didelphys*) findet sich ein partielles (*Uterus arcuatus* oder *subseptus*) bis vollständiges (*Uterus septus*) Ausbleiben der Resorption des physiologischen Septums der bilateralen Müllerganganlage, das Zervix bzw. Vagina mit einbeziehen kann und dann klinisch als Vagina duplex in Erscheinung tritt. (siehe 1.2)

Eine ausgeprägte Form der Müllergang-Fehlbildungen ist das Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-(MRKH)-Syndrom, das mit einer geschätzten Inzidenz von 1:4500 Frauen auftritt.³ Es ist in seiner isolierten Form (MRKH-Syndrom Typ I) durch eine Aplasie (von griechisch: plássein - formen, a - nicht), also eine fehlende Anlage des Uterus, der Zervix und der oberen zwei Drittel der Vagina gekennzeichnet. Liegen gleichzeitig eine renale Aplasie bzw. Dysgenese, skelettale, cardiale oder aurikuläre Fehlbildungen vor, sind die Kriterien eines MRKH-Syndroms vom Typ II bzw. einer MURCS-Assoziation erfüllt.^{4,5}

1 Einleitung

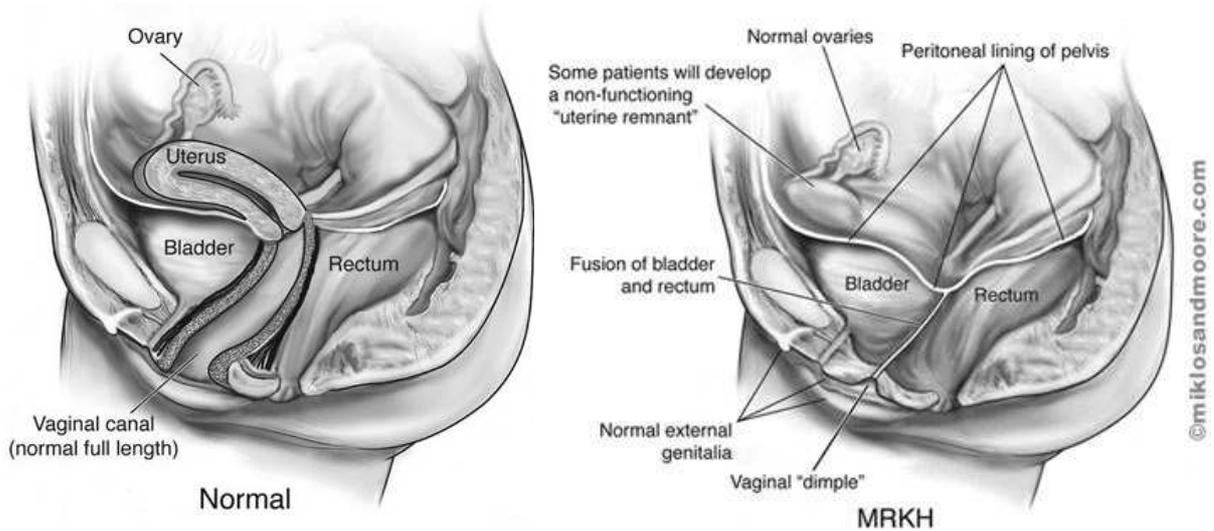


Abbildung 1 Vergleich der anatomischen Verhältnisse im kleinen Becken im Normalfall und bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom⁶

Die Diagnose MRKH-Syndrom wird bei den betroffenen Patientinnen meist erst während der Pubertät gestellt, da bei 46,XX-Karyotyp, normaler ovarieller Funktion mit unauffälligen Hormonspiegeln, normal entwickelten sekundären und äußeren weiblichen Geschlechtsmerkmalen und normaler Intelligenz das Ausbleiben der Menarche oft die Erstmanifestation darstellt.⁷ Ein vaginaler Geschlechtsverkehr wird bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom ohne therapeutische Intervention gar nicht oder nur eingeschränkt möglich sein. Zyklische Unterbauchbeschwerden sind für das MRKH-Syndrom nicht typisch, können aber auftreten, wenn rudimentäre, Endometrium enthaltende Uterusknospen vorhanden sind. Gerade in Fällen zyklisch auftretender Unterbauchbeschwerden kann es wichtig sein, differenzialdiagnostisch Ovarialzysten, eine Hymenalatresie bzw. transversale vaginale Septen sowie eine Endometriose auszuschließen.

Obwohl heutzutage durch die Möglichkeit der konservativen und operativen Anlage einer Neovagina vielen Patientinnen ein normales Sexualleben ermöglicht werden kann, darf die psychische Belastung nicht unterschätzt werden, die die Fehlbildung für die noch jungen Frauen mit sich bringt: Problembereiche sind das weibliche Selbstbild und Selbstwertgefühl sowie eine

1 Einleitung

lebenslange Infertilität.⁸ Der Verlust eines Gefühls der Zugehörigkeit und Normalität verglichen mit Gleichaltrigen und eine erschwerte sexuelle Identitätsbildung können unter Umständen Depressionen und Angststörungen bei den Betroffenen nach sich ziehen.^{9,10} Darüber hinaus kann auch die operative Vaginalrekonstruktion das Problem der Infertilität für die Betroffenen nicht beseitigen, was verständlicherweise oftmals nur schwer akzeptiert wird. Diese psychosoziale Komponente darf neben medizinischen und wissenschaftlichen Interessen sicher als Argument für eine Weiterführung der Ursachen-, Diagnostik- und Therapieforschung in Bezug auf das MRKH-Syndrom gewertet werden, das prinzipiell zu den im Bewusstsein der Allgemeinbevölkerung weniger präsenten gynäkologischen Erkrankungen zählt.

1.2 Embryologie und Grundlagen des MRKH-Syndroms

Bei Säugetieren ist die Embryonalentwicklung des Genitaltrakts eng mit der Formation der Niere und der ableitenden Harnwege verknüpft.¹¹ Der Wolff-Gang, aus dem dorsalen intermediären Mesoderm entstandener Ausführungsgang bereits der Vorniere (Pronephros), zeigt eine nach kaudalwärts gerichtete Progredienz und induziert die Bildung der Urniere (Mesonephros) und des metanephrogenen Blastems. Bei beiden Geschlechtern sind die vom Wolff-Gang aussprossende Ureterknospe und das metanephrogene Blastem Ausgangspunkt des so genannten Metanephros, der endgültigen Nierenanlage; die vorangegangenen Nierengenerationen bilden sich jeweils zurück. Zudem ist der Wolff-Gang über parakrine Zellsignale an der Differenzierung des Müllergangs beteiligt, der sich ebenfalls aus dem intermediären Mesoderm entwickelt, parallel zum Wolff-Gang verläuft und um die 6. Woche der Embryonalentwicklung bei Embryonen beiderlei Geschlechts zu finden ist.^{11,12}

1 Einleitung

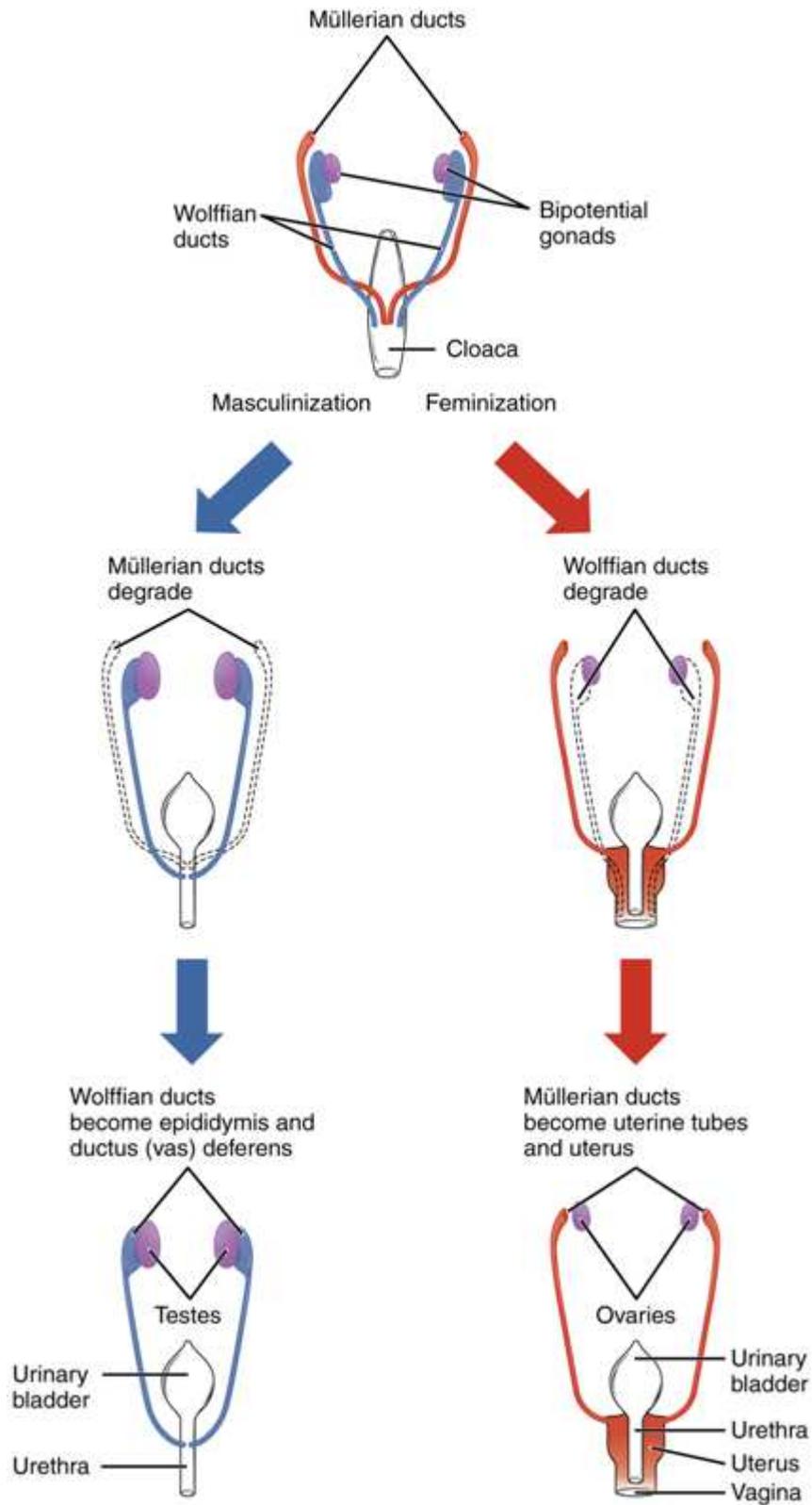


Abbildung 2 Entwicklung der zunächst indifferenten Gonadenanlage beim männlichen und weiblichen Embryo¹³

1 Einleitung

Beim männlichen Geschlecht hängt die weitere Gonadenentwicklung von der **Sex determining Region on the Y (SRY)** ab, einem Gen auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms, welches für den Testis-determinierenden Faktor (TDF) codiert. Unter seinem Einfluss entwickeln sich in der 7. Embryonalwoche (EW) die zunächst indifferenten Gonadenanlagen, bestehend aus Genitalleiste und ab der 5. EW eingewanderten Urkeimzellen, zu Hodenanlagen. In den Leydig-Zellen der männlichen Gonadenanlage wird Testosteron gebildet, welches die Differenzierung des Wolff-Gangs zu Nebenhoden, Vas deferens und Prostata vorantreibt.¹⁴ Das aus den Sertoli-Zellen der männlichen Gonaden sezernierte Anti-Müller-Hormon (AMH) leitet ab der 8. EW die Regression des Müllergangs ein. Beim weiblichen Embryo dagegen persistieren die Müllergänge, fusionieren und erhalten Anschluss an den Sinus urogenitalis. Der kraniale Anteil der Müllergänge bildet die Uranlage der Tuben, aus dem fusionierten Anteil der Müllergänge beider Seiten entwickelt sich der Ductus uterovaginalis, Vorläuferstruktur von Uterus, Zervix und der oberen 2/3 der Vagina.¹⁵ Das untere Drittel der Vagina entwickelt sich aus dem Sinus urogenitalis, wobei der untere Pol der vereinigten Müllergänge die Ausbildung zweier Uterogenitalknospen in der Hinterwand des Sinus urogenitalis induziert. Diese Sinuvaginalhöcker proliferieren und vereinigen sich zur Vaginalplatte, die durch Kanalisation von kaudal Anschluss an die oberen Anteile der Uterovaginalanlage erhält. Ein dünnes Häutchen, das Hymen, bildet die Grenze zum Sinus urogenitalis, dem späteren Vestibulum vaginae.¹⁶ Der Wolff-Gang degeneriert beim weiblichen Geschlecht in der 10. EW. Die Entwicklung des Ovars erfolgt aus der indifferenten Gonadenanlage bei fehlender SRY ohne Einwirkung von TDF in der 9. EW.¹⁴ Im Ovar gebildete Hormone, insbesondere Östrogene, stimulieren dann beispielsweise die Differenzierung der Tuben; an hypoplastischem Tubengewebe konnte eine reduzierte Zahl von Östrogenrezeptoren auf den epithelialen Zellen beobachtet werden.¹⁷

Auch uterine und vaginale Hypoplasie wurde im Zusammenhang mit einer Östrogenrezeptordefizienz beschrieben: Vor allem Östrogenrezeptor α wird normalerweise auf Uterus-, Vaginal- und Mammagewebe, aber auch in den ovariellen Thekazellen exprimiert¹¹. Im Mausmodell führte eine Inaktivierung

1 Einleitung

des entsprechenden Gens ESR1 zu Uterusrudimenten mit halbiertem Gewicht im Vergleich zu Uteri wildtypischer Artgenossen, fehlender sexueller Ausreifung und mangelndem Ansprechen von Uterus- und Vaginalepithel auf Östrogene.¹⁸

Entwicklungsgeschichtliche Ursache uteriner und vaginaler Malformationen ist meist eine Hemmungsfehlbildung der Müllergänge. Dies schließt sowohl die Aplasie als auch eine inkomplette Fusion mit ein. Bei auf Uterusebene erfolgter Fusion der Müllergänge, aber fehlender Resorption des zentralen sagittal verlaufenden Bindegewebsseptums (Relikt der Wandung der beiden Müllergänge) resultieren je nach Ausprägungsgrad Uterus septus, subseptus oder arcuatus. Eine fehlerhafte Fusion der Müllergänge auf Fundushöhe führt zum klinischen Bild eines doppelt angelegten Uteruskorpus bei einfacher Zervix (Uterus bicornis). Ist die Zervix durch Ausbleiben der Fusion ebenfalls doppelt angelegt, findet sich ein so genannter Uterus duplex bzw. didelphys.

Eine Hypoplasie (griechisch: plastein - ausbilden, formen; hypo - unvollständig) beider Müllergänge manifestiert sich mit verkümmertem Uteruskorpus bei oftmals langem und verengtem Zervikalkanal. Ist nur ein Müllergang von der Hypoplasie betroffen, resultiert ein Uterus unicornis mit einseitig normal ausgebildetem Lumen und gegenseitig fehlender oder nur rudimentär (Horn) vorhandener Uterusanlage.¹⁹ Die komplette Vaginal- und Zervixaplasie bei rudimentären Uterushörnern wird (wie bereits beschrieben) als Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser-Syndrom bezeichnet.

1 Einleitung

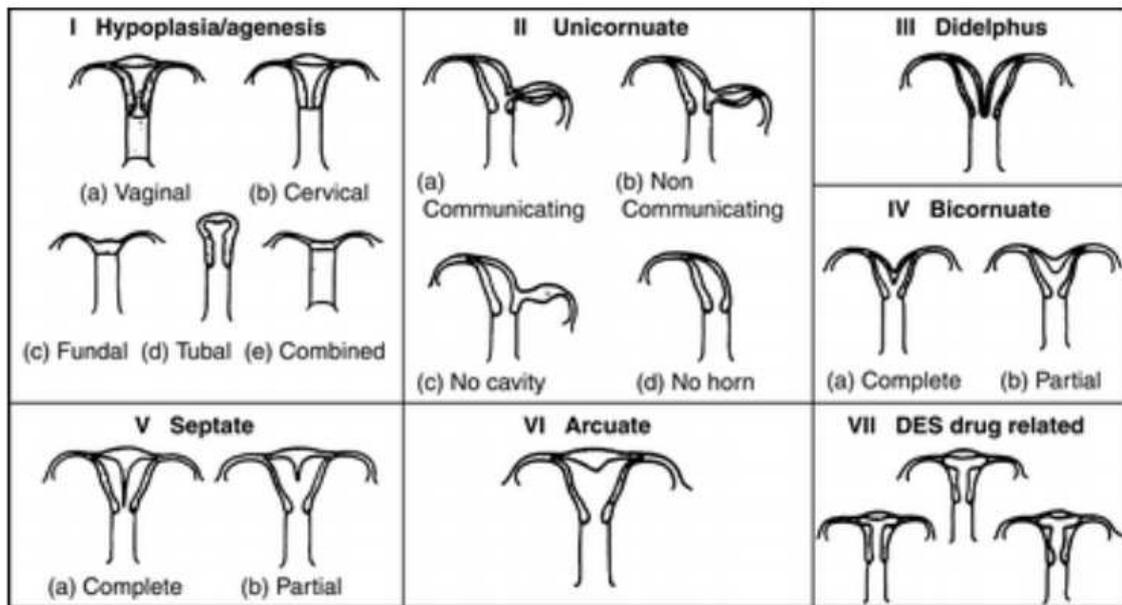


Abbildung 3 Spektrum der Müllergang-Fehlbildungen entsprechend der AFS-Klassifikation¹⁹

Eine klinisch-anatomisch orientierte Kategorisierung Müllergang-abhängiger genitaler Malformationen wurde 2013 von einer gemeinsamen Arbeitsgruppe der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) und der European Society for Gynaecological Endoscopy (ESGE) vorgestellt: Anhand eines vergleichbaren embryologischen Ursprungs der uterinen Fehlbildung (Dysmorphie des Uteruscavums/ Störung der Septumresorption/ Fusionsstörungen/ unilaterale Agenesie/Malformation) erfolgt eine Einteilung in sechs Hauptklassen (U0-U6). Innerhalb der Hauptklassen wird auf Grundlage des Schweregrades der Fehlentwicklung des Uterus weiter in Subklassen graduiert (a-c). Zervikale (C0-C4) und vaginale (V0-V4) Anomalien werden zusätzlich gesondert nach Subklassen geordnet.²⁰ Im klinischen Alltag wird sich die Praxistauglichkeit dieser alternativen Klassifikation noch beweisen müssen.

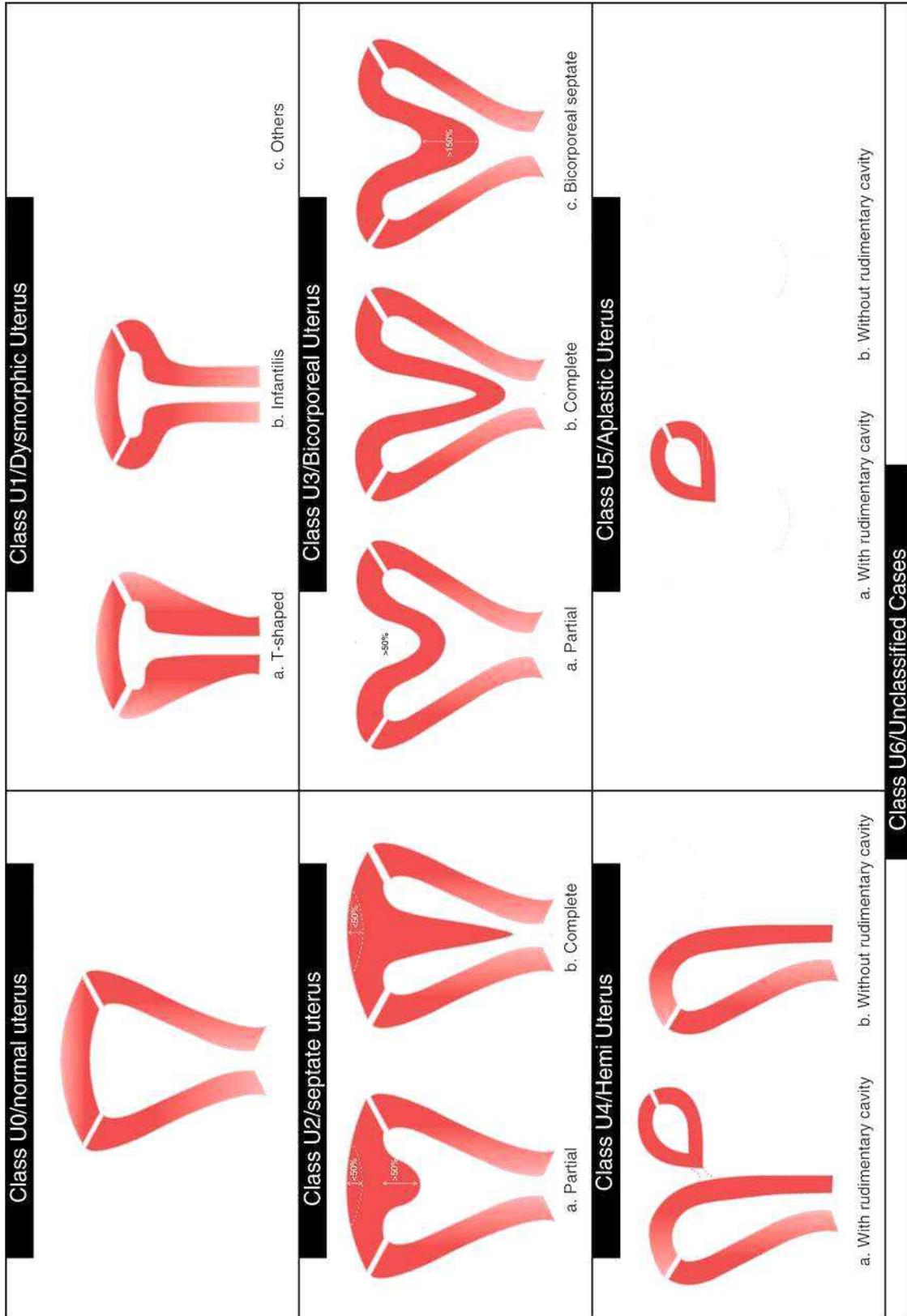


Abbildung 4 ESHRE/ESGE-Klassifikation weiblicher genitaler Fehlbildungen am Beispiel uteriner Malformationen²⁰

1 Einleitung

1.3 Geschichtlicher Abriss

Bereits Avicenna und Albucasius beschrieben im 10. bzw. 11. Jahrhundert n. Chr. die erfolgreiche Therapie einer vaginalen Aplasie.²¹ Ob es sich bei diesen Berichten tatsächlich um Patientinnen mit MRKH-Syndrom gehandelt hat, ist rückblickend nur schwer festzustellen, da eine weitere Untersuchung innerer Geschlechtsorgane zu dieser Zeit kaum möglich war.²² Sicher ist dagegen die Erstbeschreibung durch den Anatomen und Physiologen Prof. Dr. C.A. Mayer aus Bonn. In Einzelfalldarstellungen berichtete dieser von einer Kombination aus einem „bogenförmigen, unausgehöhlten Uterusrudiment“ und einer Vaginalaplasie bei Totgeburten. Irrtümlicherweise verwendete er für die beobachteten fehlgebildeten Rudimente den Begriff des Uterus bipartitus²³; dieser lateinische Ausdruck für eine zweigeteilte Gebärmutter ist zwar ebenfalls durch eine Fehlbildung der Müllergänge bedingt, beschreibt die Ausdehnung des MRKH-Syndroms aber nur unzureichend. Später (1838) beschrieb Prof. C. v. Rokitansky Einzelfälle uterovaginaler Aplasie.²⁴ Dr. H. Küster sprach 1910 unter Zusammenführung der Beobachtungen seiner Vorgänger vom Syndrom des Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida und stellte eine Literaturübersicht zum Thema zur Verfügung. Erstmals beschrieb er auch assoziierte Fehlbildungen.²⁵ G.A. Hauser und W.E. Schreiner grenzten 1961 das Krankheitsbild von der Differenzialdiagnose einer testikulären Feminisierung ab, und prägten den Terminus des Mayer-Rokitansky-Küster-Syndroms,²⁶ der später zum Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH)-Syndrom erweitert wurde.

Heute wird für die Diagnose MRKH-Syndrom die Erfüllung der folgenden Kriterien gefordert:

Kongenitale Aplasie von Uterus und oberen 2/3 der Vagina bei Frauen mit normal entwickelten sekundären Geschlechtsmerkmalen und einem normalen 46,XX Karyotyp.

1 Einleitung

Assoziierte Malformationen (MRKH Typ II/ MURCS) umfassen:

- Nierenanomalien (unilaterale Agenesie, ektope Nierenanlagen oder Hufeisenniere)
- Skelettanomalien, insbesondere Wirbelkörperanomalien (Klippel-Feil-Anomalie, Wirbelkörperfusionen (v.a. an der HWS), Skoliose)
- Hörstörungen
- selten Herz- und Fingeranomalien (Syndaktylie, Polydaktylie)³

(übersetzt nach Morcel et al., The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: clinical description and genetics, 2008)

1.4 Diagnostik des MRKH-Syndroms

Als diagnostische Möglichkeit steht neben einer Inspektion insbesondere die Sonographie zur Verfügung. Mit der Ultraschalluntersuchung können nicht nur der fehlende bzw. rudimentär angelegte Uterus, sondern auch Nierenanomalien sichtbar gemacht werden. Sensitiver und spezifischer ist allerdings die Kernspintomographie (MRT) vor allem in Bezug auf Fehlbildungen der ableitenden Harnwege. Bei uneindeutigen Befunden bzw. in der genauen morphologischen Diagnostik der Uterusrudimente ist sie der Sonografie überlegen.⁴ Zudem können skelettale assoziierte Fehlbildungen ebenfalls dargestellt werden. In seltenen unklaren Fällen ist zur definitiven Diagnosefindung eine diagnostische Laparoskopie indiziert. Eine Blutuntersuchung liefert beim MRKH-Syndrom kaum Hinweise: Bei normaler ovarieller Funktion finden sich normwertige Hormonspiegel von LH, FSH und Androgenen.⁴

1 Einleitung

1.5 Forschungsergebnisse zur Ätiologie des MRKH-Syndroms

Die Frage nach Ätiologie und genetischer Ursache des MRKH-Syndroms kann auch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht als abschließend geklärt bezeichnet werden. Erste Ansätze gingen von einem sporadischen Auftreten der Fehlbildung aus und stellten die Hypothese eines polygenetisch/multifaktoriellen Erbgangs unter Beteiligung von nichtgenetischen bzw. Umweltfaktoren auf.²⁷ Diskutiert wurde ein Zusammenhang mit Gestationsdiabetes²⁸ oder Teratogenen wie Thalidomid,²⁹ was sich in verschiedenen Fallstudien nicht bestätigen ließ.^{30,31} Aktuell favorisierte Theorien nehmen einen autosomal-dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz, variabler Expressivität und einem niedrigen Wiederholungsrisiko von 1-2 % für erstgradig Verwandte von Betroffenen an.^{4,27} Erste infrage kommende Gene (Kandidatengene) ergaben sich einerseits aus einer Assoziation des MRKH-Syndroms mit anderen genetischen Anomalien wie Galaktosämie³² oder Mukoviszidose,³³ andererseits aus der Beteiligung entsprechender Gene an der Embryonalentwicklung des weiblichen Genitaltrakts (siehe 1.2). Allerdings konnten weder Mutationen noch Polymorphismen der Gene für Galactose-1-Phosphat-Uridyl-Transferase (GALT) oder den Mukoviszidose-assoziierten Chloridkanal (CFTR) bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom als auslösende genetische Veränderung bestätigt werden.^{33,34} Auch die sich bei Betrachtung der weiblichen Urogenitalentwicklung aufdrängende These einer ursächlichen Beteiligung des Gens für das Anti-Müller-Hormon bzw. seines Rezeptors, verantwortlich für die Regression der Müllergänge, konnte bisher nicht bewiesen werden.³⁵⁻³⁷

Weitere Untersuchungen fokussierten auf Gene, die während der frühen Embryonalentwicklung aktiv sind, wie WT1 oder PAX2, deren Inaktivierung im Mausmodell zur Agenesie von Nieren und Gonaden führte. Molekulare Analysen bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom zeigten aber keine ursächlichen Mutationen oder Aktivitätsänderungen dieser Gene.^{5,38}

Andere Studien befassten sich mit der Familie der HOX-Gene, die für die kranio-kaudale Gliederung des Embryos und ebenfalls für die Organogenese

1 Einleitung

eine entscheidende Rolle spielen.³⁹ Im Mausmodell fanden sich bei homozygot HOX A10-, 11- oder 13- defizienten Individuen Anomalien in Strukturen, die aus den Müllergängen hervorgegangen waren. Festzuhalten ist auch, dass die erwähnten HOX-Gene für die Knochenentwicklung bedeutsam sind und in der Niere exprimiert werden, ein Fakt, der die Assoziation zwischen Fehlbildungen der Müllergänge, Nieren- und Skelettanomalien erklären könnte.⁵ Untersuchungen an DNA aus Blutproben von MRKH-Patientinnen konnten jedoch weder Mutationen noch Polymorphismen der Gene HOXA7 - HOXA13 feststellen.^{40,41} Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass epigenetische Mechanismen, (In)Aktivierung der Promotorregion, posttranskriptionale Mechanismen oder Veränderungen in Zielgenen der HOX-Proteine zur Ausbildung von Müllergang- abhängigen Anomalien führen, zumal Rall *et al.* zeigen konnten, dass HOXA5 und HOXA9 zu denjenigen Genen zählen, die in rudimentärem Uterusgewebe von Patientinnen mit MRKH-Syndrom vermehrt exprimiert werden und deren Methylierung im Vergleich zu Kontroll-DNA reduziert ist.⁴²

Darüber hinaus detektierte 2011 eine Array-CGH-Analyse der aus Blutproben isolierten DNA von 48 MRKH-Patientinnen LHX1, ein Gen, das für einen Transkriptionsfaktor der urogenitalen Embryonalentwicklung codiert und einer Subfamilie der HOX-Gene angehört, als weiteres Kandidatengen. Mäuse, denen dieses Gen fehlt, zeigen eine Uterus- und Tubenagenesie bei normal entwickelten Ovarien sowie eine renale Agenesie.⁴³ Eine weiterführende Studie konnte erneut eine Missense-Mutation von LHX1 bei einer Patientin mit MRKH-Syndrom und unilateraler Nierenagenesie aufdecken, die Möglichkeit einer ursächlichen Beteiligung an diesem komplexen Fehlbildungssyndrom scheint somit bestätigt.⁴⁴

Vielfach in Verbindung gebracht mit Müllergang-Aplasie und Nierenfehlbildungen wurde auch WNT4, ein Gen welches während der Embryogenese an der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen und Gewebe beteiligt ist.⁴ Loss-of-function-Mutationen von WNT4 resultieren in einem Phänotyp mit fehlenden Müllergang-abhängigen Strukturen und Nierenanomalien ähnlich dem MRKH-Syndrom, allerdings immer in

1 Einleitung

Kombination mit einer Hyperandrogenämie.^{45,46} Da beim klassischen MRKH-Syndrom eine normale Ovarialfunktion und normwertige Hormonspiegel gefordert werden, sollten urogenitale Anomalien mit Hyperandrogenismus bei WNT4-Mutation als eigene Entität vom MRKH-Syndrom abgegrenzt werden.^{4,46}

Eine ganze Reihe neuer Kandidatengene ergab sich 2011 aus der bereits erwähnten Studie von Rall *et al.* Mithilfe von Microarray-Analysen wurden Expressionsstärken und Methylierungszustand von Genen zwischen Uterusgewebe-Proben von Patientinnen und Kontrollen verglichen. Insgesamt wurden 293 signifikant differenziell exprimierte Gene detektiert. 194 Gene zeigten ein abweichendes Methylierungsmuster bei MRKH-Patientinnen. 9 Gene (HOXA5, HOXA9, WISP2, CDH5, PEG10, MFAP5, LRRC32, RALGPS2 und SMPD3) fanden sich in beiden Gruppen wieder, d.h. es kann davon ausgegangen werden, dass ein verändertes Methylierungsmuster für die differenzielle Expression bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom verantwortlich ist. Somit suggeriert diese Studie erstmalig eine Bedeutung epigenetischer Regulationsmechanismen für die Entstehung des MRKH-Syndroms.

Weitere Ansatzpunkte für die Forschung zur Ätiogenese des MRKH-Syndroms und die Grundlage dieser Arbeit liefert darüber hinaus die Analyse derjenigen Gene, die sich in der beschriebenen Studie zwar als differenziell exprimiert, nicht jedoch als methylierungsreguliert darstellen ließen. In dieser Gruppe zeigten sich Gene für Hormonrezeptoren besonders stark vertreten: Das Gen des Oxytozinrezeptors (OXTR) war in Gewebe von MRKH-Patientinnen deutlich reduziert exprimiert, während die Expressionslevel der Gene des Östrogenrezeptors α (ESR1) und des Progesteronrezeptors (PGR) erhöht gefunden werden konnten.⁴² Dies ist insofern interessant, da Ludwig bereits 1998 die These aufstellte, defiziente Hormonrezeptoren könnten an der Entstehung des MRKH-Syndroms kausal mitbeteiligt sein. Aus Beobachtungen von Differenzen zwischen ovariellern Zyklusstadium und Zustand des Endometriums im rudimentären Uterusgewebe von MRKH-Patientinnen schloss er auf eine Störung der hormonellen Stimulierbarkeit des minderentwickelten

1 Einleitung

inneren Genitales. So beschrieb er beispielsweise ein Missverhältnis zwischen normalem ovariellen Gelbkörper und fehlender Desquamation im Endometrium des Uterusrudiments oder auch eine Nichtnachweisbarkeit von Hämosiderin in endometrialem Gewebe von Patientinnen, was er als Hinweis auf nicht stattgehabte Desquamation und Blutung wertete.

Die Erklärung sah Ludwig in einer fehlerhaften Reagibilität des untersuchten Endometriums auf ovarielle Gestagene.¹⁷ Diese Hypothese fand 2013 in einer Arbeit zu Histologie und Immunhistochemie uteriner Rudimente von Patientinnen mit MRKH-Syndrom eine gewisse Bestätigung: Zwar konnte im Vergleich zu Gewebe gesunder Kontrollen keine verringerte Zahl an Östrogenrezeptoren festgestellt werden, eine Stimulierbarkeit der hormonellen Rezeptoren im Sinne einer erhöhten Proliferationsrate endometrialer Zellen war allerdings nur reduziert zu beobachten.⁴⁷

Mutationsanalysen regulatorischer Elemente und des Promotors des Anti-Müller-Hormons (AMH), das die Regression des Müllergangs beim männlichen Embryo initiiert, identifizierten darüber hinaus eine Östrogenrezeptorbindestelle als Bestandteil der Promotorregion von AMH.³⁵ Die bei der Analyse einer differenziellen Genexpression zwischen MRKH-Patientinnen und Kontrollen detektierte Überexpression von ESR1^{35,42} könnte also eine mögliche Ursache einer verstärkten Expression von AMH darstellen und somit Grundlage einer Rück- oder Fehlbildung der Müllergänge auch beim weiblichen Embryo sein. Denkbar wäre daneben eine Induktion von AMH durch eine Exposition des Ungeborenen gegenüber erhöhten maternalen Östrogenleveln, die unter anderem durch Östrogen-ähnliche Bioflavonoide (Phytoöstrogene) als Nahrungsmittelbestandteil oder -zusatz (z.B. Genistein in Sojaprodukten) zustande kommen könnten.^{11,35} Diese Annahme lässt sich weiter durch die Tatsache untermauern, dass die intrauterine Exposition gegenüber Diethylstilbestrol (DES), einem nicht steroidalen, Östrogen-mimetischen Molekül, zu uterovaginalen Fehlbildungen, insbesondere im Sinne eines T-förmigen Uterus und zu einer erhöhten Inzidenz von vaginalen und zervikalen Adenokarzinomen bei Betroffenen führt.¹¹

1 Einleitung

Neueste Ergebnisse (Stand 2014) einer Studie an fünf bezüglich MRKH-Syndrom diskordanten monozygoten Zwillingspaaren konnten Copy Number Variations (CNVs) u.a. der Gene LRP10 und MMP14 als mögliche Ursache des MRKH-Syndroms identifizieren. Beide Gene sind Bestandteil einer bei dem betroffenen Zwilling duplizierten Genregion auf Chromosom 14. LRP10 ist für die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweg von Bedeutung. Bei konstitutiver Aktivierung dieses Pathways während der Embryonalentwicklung resultieren im Mausmodell Tubenagenesie, kleinere Uteri mit dysfunktionellem Endometrium und Infertilität sowie dysproliferative Veränderungen im Epithel. MMP-14 wiederum könnte durch β -Catenin reguliert sein⁴⁸ und kontrolliert die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie die Migration glatter Muskelzellen, was für die Embryonalentwicklung des weiblichen Genitaltrakts insofern bedeutsam ist, dass der elongierende Müllergang die Extrazellulärmatrix als Leitstruktur nutzen könnte. Schließlich bot die Studie auch eine Erklärung für das sporadische Auftreten des MRKH-Syndroms und die Fälle von Diskordanz bei eineiigen Zwillingen: Beim betroffenen Zwilling waren die CNVs im Genom der Blutleukozyten und des rudimentären Uterusgewebes, nicht aber in abgeschilferten Zellen der Mundschleimhaut nachweisbar, was als Erklärungsmodell ein gewebsspezifisches Mosaik in Betracht ziehen lässt.⁴⁹

1.6 Erläuterung verschiedener Begrifflichkeiten als Vorgriff auf den Ergebnis- bzw. Diskussionsteil

1.6.1 Bedeutung posttranskriptioneller Veränderungen

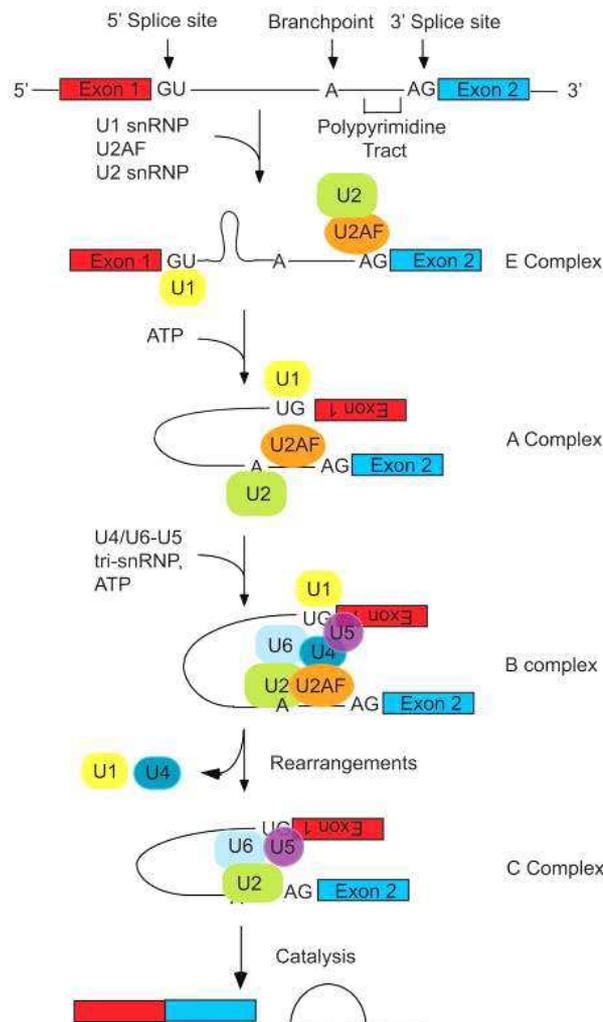
Im menschlichen Genom finden sich weniger als 5% codierende Sequenzen, die als mRNA exprimiert werden und Ausgangspunkt der Proteinsynthese sind (Exons).⁵⁰ Den Großteil humaner DNA bilden repetitive und Steuerelemente (Introns), die als so genannte „junk DNA“ nicht zur Expression kommen. Im Rahmen der Transkription wird allerdings zunächst die komplette Gensequenz

1 Einleitung

durch die RNA-Polymerase II abgelesen, als Produkt entsteht die zur DNA-Sequenz komplementäre prä-mRNA.

Durch co- bzw. posttranskriptionelle sequenzielle Modifikationen reift sie zur mRNA heran, bevor sie den Nukleus verlässt, um an den Ribosomen abgelesen und in eine Aminosäuresequenz umgewandelt zu werden (Translation). Im Rahmen dieser Modifikationen ist neben stabilisierenden Sequenzveränderungen wie der Polyadenylierung am 3'-Ende und einem Capping am 5'-Ende der prä-mRNA insbesondere das Spleißen zu erwähnen: Dieser Vorgang beschreibt die Exzision der Intronsequenzen aus der prä-mRNA sowie eine Ligation der angrenzenden Exons.

Katalysiert wird der Spleißprozess vom Spleißosom, einem Komplex aus fünf RNA enthaltenden Ribonukleoproteinen (snRNPs) und hunderten weiteren assoziierten Proteinen.⁵¹ Entscheidend für die korrekte Identifikation der Exon-Intron-Grenzen sind die Spleißstellen am 3'- und 5'-Ende des Introns, sowie die Branch Point-Sequenz, welche verschiedenen Komponenten des Spleißosoms als Bindungsstelle dienen.⁵¹



1 Einleitung

Abbildung 5 Spleißvorgang in Einzelschritten⁵²

Zunächst bindet Ribonukleoprotein U1 am 5'-Ende der prä-mRNA, woraus der early complex (E Komplex) resultiert.

Ribonukleoprotein U2AF erkennt die Polypyrimidinregion (PPT) und unter Mithilfe weiterer Faktoren werden 5'- und 3'-Ende der prä-mRNA einander angenähert.

Zur Stabilisierung dient ATP, welches die Bindung von U2 und so die Bildung des A Komplex ermöglicht.

Der B Komplex entsteht durch gleichzeitiges Anlagern der Ribonukleoproteine U4-U6.

Verschiedene Umlagerungen sowie die Abspaltung von U1 und U4 führen schließlich zur Ausbildung des C Komplex (Spleißosom). Dieser katalysiert die Exzision des Introns und Verbindung der aufeinander folgenden Exons.⁵²

Regulatorische Sequenzen, so genannte Intron- bzw. Exon-Spleiß-Enhancer oder Silencer beeinflussen zusätzlich das Zusammenlagern der einzelnen Bestandteile des Spleißosoms plus die Auswahl, Bindung und Effizienz von Spleißstellen.⁵³ Manche dieser Spleiß-Enhancer/-Silencer sind ubiquitär bzw. konstitutionell aktiv, andere dagegen nur in bestimmten Geweben oder Abschnitten der Embryonalentwicklung. Sie ermöglichen u.a. die Varianz der mRNA und somit die Bildung von Proteinen teils unterschiedlicher Funktion als Produkt einer identischen Gensequenz.⁵¹ Weitere Determinanten der Variabilität von mRNA und des alternativen Spleißens sind Mutationen der Spleißstellen. Dabei muss wiederum zwischen intronischen und exonischen Basenpaarveränderungen unterschieden werden. Häufig pathologische Mutationen betreffen die hochkonservierten Dinukleotide GT an den 5'- und AG an den 3'-Spleißstellen eines Introns, da sie für die Festlegung der Exongrenzen bedeutsam sind. Modifikationen der Basenfolge können einerseits ein Überspringen und somit die fehlende Expression eines ganzen Exons zur Folge haben, andererseits können sie im Sinne einer Frameshift-Mutation das Leseraster der Basentriplets bei der Translation verändern. Mutationen im Exon betreffen wiederum meist regulatorische Elemente und können dazu führen, dass ein Spleiß-Enhancer verloren geht oder ein Silencing Element hinzukommt, was letztlich dazu führt, dass betroffene Exons mit den Introns exzidiert werden (Exon Skipping).⁵¹

1 Einleitung

1.6.2 miRNA

MicroRNAs (abgekürzt: miRNAs) sind 21-25 Nukleotide lange, einsträngige RNA-Fragmente, deren Hauptaufgabe nach heutigem Forschungsstand in einer Negativregulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene zu sehen ist.⁵⁴ Je nach Art der Interaktion mit dem Produkt der Transkription, der MessengerRNA oder kürzer mRNA, resultieren zwei verschiedene Mechanismen der Proteinsynthesehemmung: Bei vollständiger komplementärer Basenpaarung zwischen mRNA und miRNA wird die mRNA abgebaut, besteht nur teilweise Komplementarität zwischen den Nukleotiden, wird die Translation der mRNA gestört.⁵⁵

Erstmalig beschrieben wurde eine Genregulation durch kleine, interferierende RNA-Fragmente 1993 bei Untersuchungen zur Steuerung der zeitlichen Entwicklung von Larven des Wurms *Caenorhabditis elegans*.⁵⁶ Inzwischen wurden 28.645 miRNAs⁵⁷ bei Wirbeltieren, Fliegen, Würmern, Pflanzen und selbst in Viren⁵⁸ identifiziert und ihre Bedeutung für u.a. die zeitliche Kontrolle der Embryonalentwicklung, Differenzierung hämatopoetischer Zellen, Apoptose, Zellproliferation und Organentwicklung festgestellt.⁵⁵

1.6.2.1 Biogenese und Funktion der miRNA

Für miRNA kodierende Gene finden sich zum größten Teil in intergenischen Regionen oder in entgegen gesetzter Orientierung zu bekannten Genloci, z.T. auch in Intronsequenzen. Eine RNA-Polymerase II vollführt die Transkription der betreffenden Sequenzen in ein bis zu mehrere Kilobasen langes Primärtranskript (pri-miRNA), welches von der im Kern lokalisierten RNase III Drosha geschnitten wird und sich zu einer Schleife zusammenlegt (Hairpin-Struktur). Zusätzlich erfolgt eine Polyadenylierung am 3'- und ein Capping am 5'-Ende. Die so entstandene precursor-miRNA (pre-miRNA) wird mithilfe eines nukleären Transportrezeptors, Exportin 5, ins Zytoplasma transloziert. Dort erfolgt erneut ein Zerteilungsschritt durch die zytoplasmatische RNase III Dicer

1 Einleitung

und es entsteht eine oder mehrere doppelsträngige etwa 22 Nukleotide lange, instabile miRNA duplex. Jeweils einer der beiden Stränge degeneriert.⁵⁹ Die reife, funktionsfähige miRNA assembliert mit einem Enzymkomplex, dem RNA-induced-silencing complex (RISC), welcher nun mithilfe der inkorporierten miRNA komplementäre Basenpaarungen zwischen miRNA und Ziel-mRNA erkennt und durch eine dazugehörige Endonuklease die mRNA abbauen oder die Translation der mRNA verhindern kann.⁵⁵ Eine vollständige Degradation der mRNA ist dabei Folge absolut komplementärer Basenpaarungen zwischen miRNA und mRNA, nur teilweise zueinander passende Basenpaarungen der beiden Einzelstränge führen dagegen zur Hemmung der Translation.⁶⁰

1.6.2.2 Bedeutung von miRNAs bezogen auf das MRKH-Syndrom

In einer kürzlich (2014) an der Universitätsfrauenklinik Tübingen durchgeführten Studie wurden erstmalig differenziell exprimierte miRNAs in Uterusrudimenten von Patientinnen mit MRKH-Syndrom identifiziert.

Genauer untersucht wurden die miRNA-145, da unter ihren Zielgenen HOXA9 zu finden ist, welches schon in früheren Arbeiten als bedeutsam für die Entstehung des MRKH-Syndroms gewertet wurde, sowie die miRNA-98 und -203 aufgrund ihrer Relevanz im Rahmen der Embryonalentwicklung und gynäkologischer Prozesse. Alle drei betrachteten miRNAs zeigten sich in der Gruppe der MRKH-Patientinnen im (rudimentären) Uterusgewebe stärker exprimiert als in der Kontrollgruppe.⁶¹ Eine vermehrt aktive miRNA, die die Expression ihres Zielgens reduziert, kann somit durchaus als Ursache des MRKH-Syndrom in Betracht gezogen werden, insbesondere wenn, wie im Falle der miRNA-145, Gene involviert sind, deren Rolle im Rahmen der Embryonalentwicklung des weiblichen Genitaltrakts und der Differenzierung der Müllergänge gesichert ist.

1 Einleitung

1.6.3 Internationales HapMap-Projekt

Viele der großen Volkskrankheiten wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs, Adipositas, Diabetes, entzündliche oder auch psychiatrische Erkrankungen sind nicht auf Mutationen in einem einzelnen Gen zurück zu führen, sondern das Resultat polygenetischer und umweltbedingter Einflussfaktoren.

Ziel des im Oktober 2002 initiierten internationalen HapMap-Projekts ist es, Muster genetischer Varianten im menschlichen Genom zu detektieren, die Einfluss auf die Gesundheit, die Reaktion auf Umweltreize und das Ansprechen auf Medikamente nehmen.

Grundlage bildet die Annahme, dass sich die Menschen untereinander nur in 0,1% ihrer DNA unterscheiden, wovon die häufigste Variation so genannte single nucleotide polymorphisms (SNPs) darstellen, d.h. der Austausch einer einzelnen Base an einer bestimmten Position auf einem Chromosom. Etwa 10 Millionen dieser SNPs sind in der Weltbevölkerung mit einer Frequenz von $\geq 1\%$ und somit häufig vertreten. Sie machen 90% aller genetischen Variationen innerhalb der Bevölkerung aus.⁶² Da davon ausgegangen werden kann, dass jeder SNP die Folge einer Punktmutation im Rahmen der Evolution darstellt, ist anzunehmen, dass eine Assoziation zwischen dem einzelnen SNP und den restlichen Allelen eines Chromosoms besteht.

Die Summe aller Allele eines Chromosoms charakterisiert dessen Haplotyp, der durch evolutionär bedingte Mutationen und Rekombinationsereignisse interindividuell differiert. Das gemeinsame Auftreten verschiedener SNPs im Rahmen eines solchen Haplotyps ist Voraussetzung, um anhand der Genotypisierung spezieller Marker-SNPs im Vergleich zwischen erkrankten und nicht erkrankten Personengruppen einen Großteil genetischer Variationsmuster zu identifizieren, die das Auftreten einer Erkrankung beeinflussen könnten.

Um allerdings auf diese Weise genetische Variation adäquat beschreiben zu können, muss eine ausreichende Dichte von SNPs vorbekannt sein. Zu diesem Zweck wurden bis Februar 2004 6,8 Millionen SNPs mit einer Allelhäufigkeit von mindestens 5% durch Sequenzierung detektiert. In der frei zugänglichen Datenbank dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) sind sie alle einzusehen.

1 Einleitung

Ins HapMap-Projekt eingeschlossen wurden 270 DNA-Proben von Populationsgruppen aus den USA, Nigeria, Japan und China. Dabei setzten sich die US-amerikanische und nigerianische Bevölkerungsgruppe jeweils aus Trios von zwei Elternteilen und einem Kind zusammen. Die Proben wurden so gesammelt, dass zwar eine geographische Zuordnung, aber kein Rückschluss auf das Spenderindividuum möglich ist.⁶²

1.7 Kontext der vorliegenden Arbeit und Fragestellung

1.7.1 Wegweisende Vorbefunde

Bis heute ist es trotz weitreichender Forschung nicht gelungen, die genetische Ursache des MRKH-Syndroms zu identifizieren. Untersuchungen an Genen, deren Mutation sich durch eine bekannte Beteiligung an der Embryonalentwicklung des weiblichen Genitaltrakts als potenzielle Ursache des Krankheitsbildes anbot, konnten bislang keine generalisierbare kausale monogenetische Veränderung herausstellen. Neuere Arbeiten lassen zudem eine ätiogenetische Beteiligung epigenetischer Mechanismen wie differenzielle Methylierung⁴² oder gewebsspezifische Mosaikbildung⁴⁹ vermuten. Gerade aber Daten aus der Studie von Rall *et al.* zu Ausprägungsprofilen verschiedener Gene im Vergleich zwischen Uteri gesunder Kontrollen und Uterusrudimenten von Patientinnen mit MRKH-Syndrom, die erstmals epigenetische Regulation in die Ursachendiskussion des MRKH-Syndroms einbrachte, zeigten, dass neben methylierungsregulierten auch eine Vielzahl weiterer Gene bei MRKH-Patientinnen eine differenzielle Expression aufweisen können. Unter den 293 unterschiedlich exprimierten Transkripten fanden sich u.a. HOX-Gene sowie Gene hormoneller Rezeptoren. Während allerdings für die beiden in Uterusrudimenten von Patientinnen vermehrt exprimierten Gene der HOX-Familie (HOXA5 und HOXA9) eine Demethylierung festgestellt werden konnte, fanden sich für die Methylierung der Rezeptorengene ESR1 und PGR, die ebenfalls eine Mehrexpression aufwiesen, keine signifikanten Veränderungen.

1 Einleitung

Auch OXTR, dessen Expression in Gewebe von MRKH-Syndrom-Patientinnen reduziert war, zeigte keine Veränderung im Methylierungsmuster.⁴² Diese Befunde legen die Überlegung nahe, dass die Ursache des veränderten Ausprägungsprofils der genannten Gene in einer möglicherweise die Funktion korrumpierenden Mutation zu suchen ist. Eine kompensatorische Überexpression eines defizienten Gens könnte eine verstärkte Transkription wie im Falle von ESR1 und PGR erklären. Die 2013 von Rall *et al.* immunhistochemisch nachgewiesene verminderte Stimulierbarkeit von Östrogenrezeptoren in rudimentärem Uterusgewebe von MRKH-Patientinnen scheint ebenfalls auf eine funktionsbeeinträchtigende Mutation im Bereich hormoneller Signalwege hinzudeuten.⁴⁷

Der reduzierte Nachweis des OXTR-Transkripts ließe sich beispielsweise im Sinne einer Nonsense-Mutation mit verfrühtem STOP-Codon interpretieren.

1.7.2 Konkrete Fragestellung dieser Dissertation

Die vorliegende Arbeit will diesen Theorien nachgehen und anhand einer Sequenzierung der Gene für den Östrogenrezeptor α (ESR1) und den Oxytozinrezeptor (OXTR) erstmals eine Mutationsanalyse dieser beiden Gene bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom vorlegen. Unter dieser Zielsetzung soll die basengenaue Evaluation sequenzierter DNA der 93 inkludierten Patientinnen Änderungen der Basenfolge detektieren, die als potenziell pathogen einzustufen sind. Es soll auf diese Weise geklärt werden, inwieweit ein Austausch einzelner Basen innerhalb der Gene **OXTR** oder **ESR1** die Funktion der entsprechenden Rezeptoren negativ beeinflussen bzw. aufheben kann. Eine Basensubstitution, die potenziell eine Defizienz des codierten Rezeptorproteins auslösen könnte, darf dann auch zu Recht als mögliche Ursache der Entstehung des MRKH-Syndroms angesehen werden.

Somit versteht sich diese Dissertation als weiteren Beitrag auf dem Weg zur Klärung der Ätiogenese des MRKH-Syndroms, welche wiederum die Grundlage für neue Therapieansätze darstellen könnte.

1 Einleitung

Die Abfolge von Isolation, Amplifikation und Sequenzierung der Patientinnen- und Kontroll-DNA sowie alle Zwischenschritte sind in der folgenden Abbildung als methodischer Pfad dargestellt.

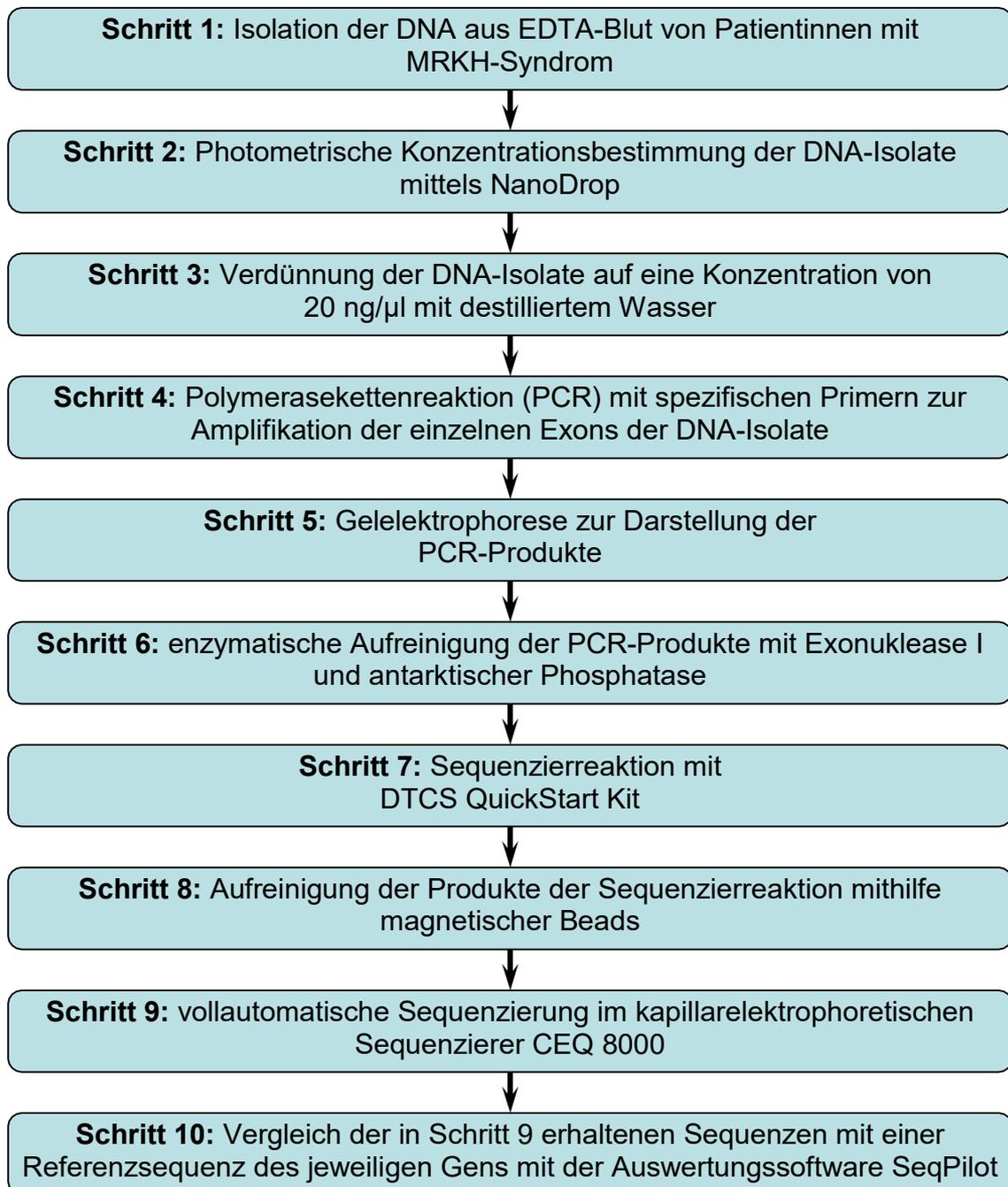


Abbildung 6 Abfolge der Einzelschritte des methodischen Vorgehens im Rahmen der vorliegenden Arbeit

2 Material und Methoden

2.1 Primer

Die Oligonukleotidprimer für die Polymerasekettenreaktion (PCR) des Gens für den Oxytozinrezeptor (OXTR; NM_000916.3⁶³) und des Gens für den Östrogenrezeptor α (ESR1; NM_0011227421⁶³) wurden jeweils mithilfe von ExonPrimer⁶⁴ generiert und von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) in einer Konzentration von 100 μ M produziert. Exon 03 und 04 von OXTR (1062 bp bzw. 1408 bp) sowie Exon 03 von ESR1 (522 bp) mussten aufgrund ihrer Größe zur Amplifikation in kleinere Einzelfragmente untergliedert werden.⁶⁴

Zudem wurden alle Primer in einer um die Sequenz M13 (5'-gtaaacgacggccagtg-3') bzw. M13rev (5'-ggaaacagctatgaccatga-3') verlängerten Version bezogen. Diese im Sinne eines Universalprimers fungierenden zusätzlichen Basen ermöglichen ein Anlagern der Primer an die zu vervielfältigende DNA auch noch bei unter der optimalen Annealing-Temperatur der spezifischen Primer liegenden Temperaturen während eines PCR-Zyklus und erhöhen somit die Amplifikationsrate.⁶⁵ Die Sequenzen der einzelnen Primer können im Anhang (siehe 6.2) eingesehen werden.

Für die Sequenzierreaktion wurden als Primer ausschließlich M13 bzw. M13rev eingesetzt, die Synthese erfolgte ebenfalls durch die Firma Metabion, Martinsried.

2.2 Größenstandard für die gelelektrophoretische Analyse

0,1 - 10,0 kb DNA-Leiter (PEQ-Gold)

1 μ l Ladder peqLab Gene Ruler Mix

Peqlab, Erlangen

1 μ l 6x Loading Dye

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

4 μ l H₂O AccuGene

Lonza, Basel

2 Material und Methoden

2.3 vorgefertigte Reaktionslösungen

Tabelle 1 vorgefertigte Reaktionslösungen

Name	Hersteller
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Fast-Start-Kit mit dNTPs	Roche, Mannheim
GenomeLab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CleanSEQ	Agencourt Bioscience Corporation, Beverly MA, USA
Sample Loading Solution	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CEQ Sequence Separation Buffer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Separation Gel	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

2.4 Enzyme

Tabelle 2 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Proteinase K	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
FastStart Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
Antarctic Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Exonuclease I (E.coli)	New England BioLabs, Frankfurt am Main

2.5 Chemikalien

Tabelle 3 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Life Technologies, Darmstadt
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Betain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Q-Solution	Qiagen, Hilden
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid 1,5%	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Mineral Oil	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

2 Material und Methoden

2.6 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
10x TBE	100 mM Trisbase (Roth, Karlsruhe) 100 mM Borsäure (Roth, Karlsruhe) 20 mM EDTA (pH 8,0) (Sigma- Aldrich, Steinheim)
Blaupuffer	8% Ficoll (GE Healthcare, Freiburg) 1% TBE 0,02% Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.7 Geräte

Tabelle 3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Qiagen Biorobot 8000	Qiagen GmbH, Hilden
Zentrifuge 5804 und 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Eppendorf BIOPhotometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Bügeleisen	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
ep384 Cyclor	Roche, Mannheim
Mikrowelle MG-3724V	LG Electronics Deutschland GmbH, Willich
Elektrophoresekammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
OLYMPUS Camedia C-5050 Zoom	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
CEQ 8000 Zyklussequenzierer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Magnetplatte	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Pumpe	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Research Pipette 10/100/1000	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Multipette® plus	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

2 Material und Methoden

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Blutröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Safe-Lock Tubes 1ml/2ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Tubes ohne Safe-Lock	Sarstedt, Nümbrecht
Rotor Adapter	Qiagen, Hilden
1,5 ml microcentrifuge tube	Sarstedt, Nümbrecht
QIAmp Spin Column	Qiagen, Hilden
Disposable Filter-Tips 1000µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Disposable Filter-Tips 200µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
96-well PCR-Plate	4titude, Berlin
Folie Adhesive PCR Film	ABgene, Hamburg
Adhesive PCR Film	ThermoScientific, Schwerte
PP-Test Tube 15 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Filter Tips 10µl	Corning (Axygen), Amsterdam
Beckman 96-well Platten	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Multipettenspitzen 100µl	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Uvette®	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Handschuhe	Hartmann, Heidenheim

2 Material und Methoden

2.9 Software und Internetressourcen

Tabelle 5 Software und Internetressourcen

Software	Hersteller
Qiasoft 5 Vers. 5.0.0.1400	Qiagen, Hilden
NanoDrop 2000 Software	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Argus X1 Vers. 3.3.1	Biostep GmbH, Jahnsdorf
CEQ8000 Genetic Analysis System Software Vers. 9.0.25	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Sequence Pilot Vers.4.1.2	JSI medical systems GmbH, Ettenheim
Alamut	Alamut® Visual
Internetressource	URL
UCSC Genome Bioinformatics Human (Homo sapiens) Genome Browser	http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?redirect=auto&source=genome.ucsc.edu
ExonPrimer	https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerR.pl?dir=/
ENSEMBL Human Genome Browser	http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/
ESP ExomeVariant Server	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml
HapMap Homepage	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/
Datenbank dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
European Variation Archive	http://www.ebi.ac.uk/eva/

2.10 Methoden

2.10.1 Patientenkollektiv/ Untersuchungsmaterial

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde DNA aus Blutproben von 97 Patientinnen der Universitätsfrauenklinik Tübingen mit MRKH-Syndrom vom Typ I oder II isoliert. 93 Proben erbrachten eine für die Amplifikation ausreichende DNA-Konzentration von $> 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ und wurden auf Mutationen im Gen des Oxytozin- bzw. Östrogenrezeptor α untersucht. Die Studienteilnehmerinnen hatten nach entsprechender Aufklärung einer Blutentnahme zu Forschungszwecken zugestimmt. Als Kontrollen dienten c134503, c134504, c134903 und c134904 aus der Sammlung lymphoblastischer Zelllinien und entsprechender DNA des Centre d' Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) der Jean Dausset-Stiftung in Paris. Ziel der Untersuchungen war, DNA-Varianten in den Genen OXTR bzw. ESR1 zu detektieren, die ausschließlich bei MRKH-Patientinnen und nicht bei Kontrollen zu finden waren. Diese Punktmutationen sollten von einer Software zur Vorhersage der Auswirkung einer Basenveränderung auf DNA-Ebene auf die Aminosäuresequenz (PolyPhen2) als nicht-synonymer Aminosäureaustausch und somit als potenziell pathogen eingestuft werden.

Das experimentelle Vorgehen erfolgte in Übereinstimmung mit der Ethik-Kommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen: Alle verwendeten Blutproben entstammen ausschließlich der bereits bestehenden und im Rahmen des Projektes Nr. 28/2008BO1 fortlaufend geführten Blut-/Gewebebank der Universitätsfrauenklinik Tübingen. Deren Aufbau war mit Zustimmung aller Studienteilnehmerinnen zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Blut- bzw. Gewebeproben („Standardinformation und Einwilligungserklärung zur Entnahme und Aufbewahrung von Blut und (Tumor-) Gewebe im Rahmen ergänzender wissenschaftlicher Untersuchungen“ AZ 397/2006; Überarbeitung vom Oktober 2007) möglich geworden. Eine Verlängerung des bestehenden Ethikvotums datiert auf den 04.09.2012 (Tübingen: 205/2015BO1 - "Untersuchung von genetischen und epigenetischen

2 Material und Methoden

Ursachen bei Patientinnen mit Uterus- und Vaginalaplasie und anderen genitalen Fehlbildungen.").

2.10.2 DNA-Isolation – Roboter

23 der verwendeten DNA-Proben wurden mittels QiaCube gemäß dem Herstellerprotokoll aus jeweils 200µl EDTA-Blut isoliert. Bei einem Elutionsvolumen von 100µl ergaben sich bei Messung mithilfe des NanoDrop 2000-Spectrophotometers DNA-Konzentrationen von etwa 49,0ng/ µl. Die Reinheit der isolierten DNA wurde anhand der 260/280 Ratio, dem Verhältnis der Absorption bei Licht der Wellenlänge 260 bzw. 280 nm, überprüft. Die geforderte Ratio von ~1,8 wurde bei allen Isolaten erreicht.

2.10.3 DNA-Isolation – manuell

Die DNA aus 70 weiteren Proben wurde von Hand nach standardisiertem Protokoll (QIAmp DNA Purification from Blood or Body Fluids) aus ebenfalls jeweils 200 µl EDTA-Blut gewonnen. Dazu erfolgte ein Aufschluss der Blutleukozyten mithilfe des Lysepuffers Buffer AL und ein Proteinverdau durch Proteinase K. Zur Ausfällung der DNA unter Zuhilfenahme einer QIAmp-Spinsäule wurde absolutes Ethanol ($\geq 99,8\%$) verwendet. In zwei weiteren Schritten wurde die DNA anschließend unter Einsatz von Buffer AW1 und AW2 gewaschen und im letzten Schritt in 100 µl Buffer AE eluiert.

Die Bestimmung der erzielten DNA-Konzentration sowie die Reinheitsprüfung erfolgten wie bei der Isolation durch den QiaCube mit dem Spectrophotometer NanoDrop 2000 (s.o.). Es ergab sich eine mittlere Konzentration von 38,3 ng/ µl; die erforderliche 260/280 Ratio von ~1,8 konnte erneut bei der Mehrzahl der Isolate festgestellt werden.

2.10.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)⁶⁶

Ziel der so genannten Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die enzymatische Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente. Die eingesetzte hitzestabile Taq-Polymerase (Taq steht für *Thermophilus aquaticus*, ein in heißen Quellen und Geysiren, beispielsweise im Yellowstone-Nationalpark lebendes Bakterium)⁶⁷ ist unter Zusatz von spezifischen Primern, Nukleotiden (dNTPs), MgCl₂, Puffer, Betain, Q-Solution und der zu amplifizierenden DNA bei vorgegebener Temperatur in der Lage, DNA-Fragmente *in vitro* exponentiell zu replizieren. Prinzipiell handelt es sich bei der PCR um eine dreischrittige Reaktion: Zunächst erfolgt bei einer Temperatur von 94°C die Denaturierung der DNA-Stränge, was im zweiten Schritt die Anlagerung der Primer-Oligonukleotide als Startpunkte der Polymerase ermöglicht. Die dazu nötige Annealingtemperatur liegt unter der Denaturierungstemperatur. Im letzten Schritt bildet die Polymerase bei einer Temperatur von 72°C, beginnend am Primer, einen neuen, zur Ausgangssequenz komplementären DNA-Strang. Diese drei Schritte werden zyklisch mehrfach durchlaufen, um eine möglichst hohe Amplifikationsrate zu erzielen.

Die in der vorliegenden Studie durchgeführte PCR weicht von diesem Standardprotokoll in einigen Punkten ab:

Im Sinne einer Touchdown-PCR wurde in den ersten Zyklen die Annealingtemperatur nur knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur gewählt, was eine äußerst spezifische Primerbindung ermöglicht. Somit wird eine Amplifikation unspezifischer DNA-Sequenzen vermieden. In den weiteren Zyklen wurde stufenweise die Annealingtemperatur reduziert. Unspezifische Bindungen werden dadurch zwar möglich, allerdings verhindern die spezifischen Replikat vorangegangener Reaktionszyklen eine übermäßige Vervielfältigung unspezifischer Sequenzen.⁶⁸ Darüber hinaus erfolgte zu Beginn ein längerer Denaturierungsschritt und am Ende des Protokolls ein ausgedehnter Verlängerungsschritt. So können schon ab dem zweiten Replikationsschritt die gewünschten Produkte gewonnen werden, deren Anzahl sich (beinahe) entsprechend eines exponentiellen Wachstums der Sättigung

2 Material und Methoden

annähert. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte des verwendeten PCR-Protokolls nochmals im Detail aufgeführt:

PCR-Programm (40 Zyklen)

5 min	95°C		Denaturierung
30s	94°C	}	10 Touch Down–Zyklen
30s	64°C - 1°C/Zyklus		
30s	72°C		
30s	94°C	}	30 Zyklen
30s	54°C		
30s	72°C		
7min	72°C		Verlängerung

Standard-Reaktionsansatz

10 x PCR-Puffer + MgCl ₂	2,5µl
dNTPs (10 mM)	0,5µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Betain	2,0µl
Q-Solution	2,0µl
Primer (10 pmol/µl)	2,0µl
DNA (20 ng/µl)	1,0µl
H ₂ O	14,8µl

2 Material und Methoden

2.10.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um die amplifizierten DNA-Fragmente nachzuweisen und ihre Größe zu kontrollieren.

Als Trärgel wurde dabei eine Mischung aus Agarose und 1x TBE unter Zusatz von Ethidiumbromid verwendet. Das ausgehärtete Gel wurde in einer mit TBE-Puffer befüllten Elektrophoresekammer platziert, anschließend wurden die einzelnen Geltaschen mit einer Mischung aus jeweils 5 µl Probenmaterial und 3µl Blaupuffer beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90V innerhalb von etwa 35 min.

Unter UV-Durchleuchtung konnten die einzelnen Banden sichtbar gemacht und somit der Erfolg der PCR anhand des Vorhandenseins von Banden der bekannten Fragmentlänge überprüft werden.

DNA wandert aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrates im elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Dabei legen kleinere Fragmente in kürzerer Zeit eine längere Strecke zurück als große. Auf diese Weise erfolgt eine Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe. Die Verwendung eines 0,1-10 kb Größenstandards, einer so genannten Leiter, die ebenfalls im elektrischen Feld aufgetrennt wird, ermöglicht das Abschätzen der Fragmentlängen. Der zugefügte Ladepuffer (Blaupuffer) stabilisiert die DNA und kennzeichnet durch den zugesetzten Farbstoff die Lauffront. Die Eigenschaft von Ethidiumbromid, mit der DNA zu interkalieren, die dessen mutagene Wirkung ausmacht, wird ausgenutzt, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen: Bei Einlagerung von Ethidiumbromid zeigt die DNA unter UV-Licht eine Fluoreszenz, die mittels einer einfachen Fotokamera festgehalten und ausgewertet werden kann.

2.10.6 Exonuklease I/ antarktische Phosphataseverdau der PCR-Amplifikate

In Vorbereitung auf die nachfolgende Sequenzierreaktion wurden die DNA-Amplifikate, die in der PCR gewonnen wurden, enzymatisch aufgereinigt.

2 Material und Methoden

Exonuklease I, aus *Escherichia coli* isoliert, entfernt überschüssig gebundene Primer-Oligonukleotide, die eine Sequenzierung stören würden. Die antarktische Phosphatase, ebenfalls aus *Escherichia coli*, beseitigt Phosphatreste am 5'-Ende und verhindert so einen Ringschluss der Fragmente.⁶⁹ Zur enzymatischen Aufreinigung wurde die Proben-DNA mit den beiden Enzymen und entsprechenden Puffern zunächst 15 min bei 37°C, dann weitere 15 min bei 80°C und zuletzt 10 min bei 15° C inkubiert.

2.10.7 Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierreaktion wurde das GenomeLab DTCS Quick StartKit verwendet.

Neben eines vorgefertigten DTCS QuickStart Master Mix wurden dem aufgereinigten PCR-Produkt dabei Q-Solution, Betain sowie der bereits beschriebene M13-Primer zugesetzt. Mit Wasser wurde auf ein Volumen von 10µl aufgefüllt. Die Menge des einzusetzenden PCR-Produktes wurde aus der Breite der in der Gelelektrophorese erzeugten Bande abgeleitet und variierte zwischen 0,5 und 0,8µl. Ziel war, die für die automatische Auswertung der Sequenzierung mithilfe des Kapillarelektrophoresegerätes der Firma Beckman-Coulter optimale DNA-Menge von 150-200 ng zu erreichen. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit Ausnahme von Exon 06 des Gens ESR1 (siehe 3.2) monodirektional vorwärts in 40 Zyklen im selben Cyclyer, der bereits für die PCR-Reaktion zum Einsatz kam. Im Folgenden ist das verwendete Programm nochmals im Einzelnen aufgeführt:

Sequenzier-Programm (40 Zyklen)

90s	94°C	}	40 Zyklen
20s	96°C		
20s	60°C		
60s	60°C		

2 Material und Methoden

Standard-Reaktionsansatz

Primer (10pmol)	1,2µl
DTCS QuickStart Master Mix	3,0µl
Q-Solution	1,0µl
Betain	1,0µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	0,5-08µl (je nach Bandenbreite)
Auf 10µl mit H ₂ O	

2.10.8 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion

Um überschüssige fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die eine kapillarelektrophoretische Auftrennung stören und die Auswertung beeinträchtigen würden, zu eliminieren, erfolgte eine Aufreinigung der Produkte der Sequenzierreaktion mittels Fertiglösung CleanSeq von Agencourt. Magnetisch ausrichtbare Beads binden hierbei die DNA-Fragmente, werden bei Inkubation auf einer Magnetplatte angezogen und sinken zu Boden. Der Überstand, der unter anderem die überschüssigen Nukleotide enthält, kann verworfen werden. Es erfolgten jeweils zwei Reinigungsschritte mit 85%igem Ethanol, anschließend wurde in Sample Loading Solution (SLS) reeluiert und die Lösung auf die Beckman 96-well Sequenzierplatte überführt. Zuletzt wurden die Proben mit jeweils einem Tropfen Mineralöl überschichtet um ein Verdunsten des Ansatzes während der Kapillar-elektrophorese zu vermeiden.

2.10.9 vollautomatische Sequenzierung mittels CEQ 8000

Zur Sequenzierung der an die Beads gebundenen DNA-Amplifikate wurde das vollautomatische Sequenziergerät CEQ 8000 der Firma Beckman-Coulter verwendet. Bis zu acht Proben können gleichzeitig über Glaskapillaren aufgetrennt werden, ein kompletter Durchlauf ermöglicht die Analyse von 96 Proben innerhalb von etwa 16h. Als Programm wurde LFR-1 eingesetzt,

2 Material und Methoden

welches optimal für PCR-Fragmente geeignet ist und sich wie folgt zusammensetzt:

Temperatur der Kapillaren 50°C

Denaturierungstemperatur 90°C

Dauer Denaturierung 120 s

Spannung bei Injektion 2 kV

Dauer der Injektion 15 s

Auftrennungsspannung 4.2 kV

Auftrennungsdauer 85 min

Dauer bis Spannung erreicht (ramp duration) 5 min

Eine erste Darstellung der ausgelesenen Sequenzen erfolgte mit der zum Sequenziergerät kompatiblen Genetic Analysis System Software, die weitere Auswertung und genauere Analyse mit Sequence Pilot Vers.4.1.2.

2.10.10 Abgleich gefundener Sequenzveränderungen mit bestehenden Datenbanken

Bei der Auswertung mit dem Programm Sequence Pilot ergaben sich durch Vergleich der Ergebnisse der Sequenzierung mit der bekannten Basenfolge des jeweiligen Gens (entnommen aus Ensembl) Stellen veränderter Basenfolge. Diese so gefundenen Punktmutationen wurden mithilfe der Datenbank dbSNP auf bereits beschriebene Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) überprüft. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme des Vorhersageprogramms PolyPhen2 untersucht, welche Auswirkung eines solchen Basenaustauschs auf die Aminosäuresequenz erwartet werden konnte. Zuletzt wurden mittels ESP Exome Variant Server mögliche Effekte von Punktmutationen auf das Spleißen der prä-mRNA ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse von DNA-Isolation, PCR und Sequenzierung

Die Isolation der DNA aus EDTA-Blut von 97 Patientinnen mit MRKH-Syndrom erbrachte in 93 Fällen eine für die folgenden chemischen Reaktionen ausreichende Konzentration von >10 ng/µl (siehe 2.10.2 und 2.10.3).

Für 92 Proben plus vier Kontrollen (CEPH-DNA) konnten sämtliche vier Exons von OXTR in der PCR amplifiziert werden. Aufgrund einer Exonlänge von >500 bp wurden dazu Exon 03 in drei Fragmente und Exon 04 in vier Fragmente untergliedert. Auf eine Vervielfältigung der Fragmente 04_2 – 04_4 wurde verzichtet, da sie vollständig im Bereich der nicht translatierten Region am 3'-Ende (3'-UTR) des Gens liegen und nach heutigem Forschungsstand eine Aussage über Auswirkungen von Basenveränderungen dieser Region auf die Proteinfunktion nur in wenigen Einzelfällen möglich ist.

Die PCR aller zehn Exons von ESR1 war ebenfalls für 92 Proben und 4 CEPH-DNAs erfolgreich. Hierzu wurde Exon 03 in zwei Fragmente und Exon 10 in zwölf Fragmente untergliedert, wobei nur Exon 10_1 amplifiziert wurde, da der übrige Anteil von Exon 10 zur schwer zu interpretierenden 3'-UTR des Gens zählt.

Sämtliche in der PCR amplifizierten Fragmente konnten enzymatisch aufgereinigt und anschließend mithilfe des Kapillarelektrophoresegerätes von Beckman-Coulter sequenziert werden (siehe 2.10.6-2.10.9).

Bei der Sequenzierung des PCR-Fragments der Größe 505bp, das zur Vervielfältigung von Exon 06 gewählt wurde, zeigte sich im Bereich des Introns, an Pos. 57 – 63 des Fragments, ein Poly-T-Stretch. Nach Homopolymerregionen findet sich oftmals eine Beeinträchtigung der Sequenzqualität, da es durch Repetition einer Base zu einem „Rutschen“ („slippage“) der Polymerase kommen kann, wodurch der wachsende Strang während der Elongation der Homopolymerregion nicht mehr korrekt mit dem Templatestrang hybridisiert.⁷⁰

3 Ergebnisse

Um bei der geringen Entfernung des beschriebenen Poly-T-Stretches zum Startpunkt des Exons (Pos. 82 des Fragments) und einer Primerlänge von 20bp ohne Sequenzverlust nach der etablierten Methode (siehe 3.1) fortfahren zu können, erfolgte für alle weiteren Proben eine Sequenzierung des betreffenden Exons in gegenläufiger Richtung mit M13rev als Primer.

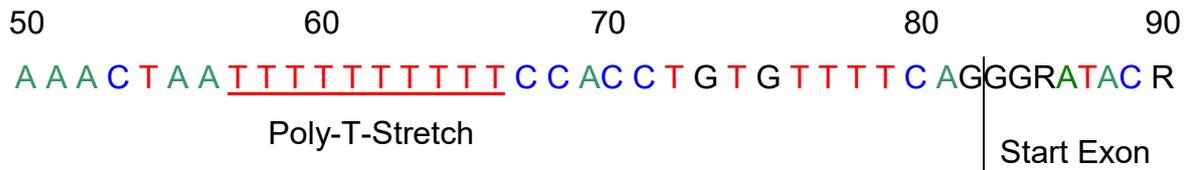


Abbildung 7 Darstellung des Poly-T-Stretches in Exon 06 des Gens für den Östrogenrezeptor α (ESR1)

Für die sich anschließende Analyse der mittels gerätekompatabler Software von Beckman-Coulter ausgelesenen Sequenzen mit dem Auswertungsprogramm SeqPilot Vers.4.1.2 war die Installation einer Referenzsequenz nötig, um Differenzen der erhaltenen Basenfolge zur bekannten Sequenz des jeweiligen Gens detektieren zu können. Die Referenzsequenz konnte nach geringfügigen Anpassungen der Exonbenennung aus Ensembl (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/) übernommen werden.

3 Ergebnisse

3.2 Ergebnisse der Sequenzanalyse des Gens für den Oxytozinrezeptor (OXTR; NM_000916.3⁶³)

Das Gen des Oxytozinrezeptors, OXTR (NM_000916.3⁶³), liegt auf Chromosom 3, Position 8.750.408 - 8.769.628⁷¹ des Gegenstrangs (Minusstrang) und ist somit 19.220 bp lang. Das Gen umfasst vier Exons, wobei nur Exon 03 und ein Teil von Exon 04 zur Aminosäure-codierenden Region zählen, die Exons 01 und 02 sowie der 3'-Anteil von Exon 04 werden nicht translatiert (5'- bzw. 3'-UTR).⁷²

Die folgende Tabelle zeigt die Exonkoordinaten von OXTR auf Chromosom 3 entsprechend Transkript ENST00000316793,⁷¹ die Positionen der für die PCR eingesetzten Primer, sowie die Größe der resultierenden Amplifikate.⁶⁴ Exon 03 und 04 mussten aufgrund ihrer Länge von >400bp für die PCR in mehrere Fragmente zerlegt werden.

Tabelle 6 Exonkoordinaten von OXTR (NM_000916.3⁶³) entsprechend des Transkripts ENST00000316793⁷¹

Exon	Größe	5'-Exongrenze	3'-Exongrenze	Start 5'-Primer/ Primergröße	Start 3'-Primer/ Primergröße	Amplifikatgröße
01	384bp	8.769.617	8.769.231	8.769.670/ 20bp	8.769.175/ 18bp	514bp
02	96bp	8.768.591	8.768.496	8.768.652/ 21bp	8.768.441/ 17bp	232bp
03_1	354bp	8.768.329		8.768.413/ 19bp	8.767.950/ 18bp	482bp
03_2	354bp			8.768.040/ 17bp	8.767.593/ 21bp	469bp
03_3	354bp		8.767.266	8.767.676/ 21bp	8.767.220/ 19bp	476bp
04_1	352bp	8.753.224		8.753.354/ 21 bp	8.752.845/ 20bp	469bp
04_2- 04_4	1056bp		8.750.408			

Im Anhang sind die Sequenzen der einzelnen Primer einzusehen.

Bei der Sequenzanalyse von OXTR detektierte SNPs und sonstige Basenveränderungen sind in der nachfolgenden Tabelle in Übersicht aufgeführt. Die Notation erfolgte in Anlehnung an die Darstellung in SeqPilot Vers.4.1.2 als cDNA-Code. Nicht hervorgehobene Basensubstitutionen sind als häufig auftretende Varianten ohne pathogenen Effekt zu werten; kursiv notierte Stellen erforderten eine detaillierte Untersuchung, sind aber eher als irrelevant für die

3 Ergebnisse

Ätiogenese des MRKH-Syndroms einzustufen, während fett gedruckte SNPs als diskussionswürdig und möglicherweise mitverursachend für das MRKH-Syndrom angesehen werden können. Fehlende Sequenzteile sind unterstrichen.

3 Ergebnisse

Tabelle 7 Bei Sequenzanalyse von OXTR (NM_000916.3⁶³) detektierte Basenveränderungen
 (nicht hervorgehoben - *apathogene, häufige Varianten*
kursiv - *eher nicht relevant für die Ätiogenese des MRKH-Syndroms*
fett - *diskussionswürdige, möglicherweise pathogene Varianten*
unterstrichen - *Sequenzteile fehlen*)

rs-Nummern aus der Datenbank dbSNP⁷³

Patientinnenprobe	Ex01	Ex02	Ex03	Ex04_1
c134503				
c134504	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
c134903	c.-551C>T (rs2301260)		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
c134904	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a01	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a02	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.690C>T (rs237902)	
a03			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a04	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a05	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a06	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a07			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a08	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a09	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a10	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a11			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a12	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a13	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a14			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a15	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	

3 Ergebnisse

a17	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a18			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	
a19	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a20	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a21			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a22			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a23	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a24	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a25	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a26	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a27	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a28	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a29	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a30			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a31			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	
a32	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911)	
a33	c.-551C>T (rs2301260)		c.-135C>T(rs237911) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	
a34	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a35	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a36	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a37	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a38			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a40			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a41	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a43			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a44	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a46			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	c.*118C>A
a47	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a48	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a49	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a50	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a51	c.-485T>C		c.-135C>T(rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	

3 Ergebnisse

a52	c.-485T>C		c.-135C>T(rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	
a53			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a54	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a55	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a56	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a57	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a58	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a59			c.-135C>T(rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	c.*118C>A
a60	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a62	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a63	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a64	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a65			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a66			<u>Ex03 1fehlt</u> c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a67	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a68	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a69	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a70	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a71	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a72	c.-551C>T (rs2301260) c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a73	c.-485T>C		c.-135C>T(rs237911) c.171C>T(rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	c.*118C>A
a74	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a75	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a76	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a77	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a78			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	
a79	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a80	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a81	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a82			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a83	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a84	c.-485T>C		c.-135C>T(rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	c.*118C>A
a85	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	c.*118C>A
a86	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a87	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a88			c.-135C>T(rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902) c.712G>A (rs61740241)	c.*118C>A
a89			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a90			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a91	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.-133A>C c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a92			c.-135C>T (rs237911) c.-133A>C c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a93	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	
a94			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.652G>A (rs4686302)	
a95	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A
a96			c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485) c.690C>T (rs237902)	c.*118C>A

3 Ergebnisse

a97	c.-485T>C		c.-135C>T (rs237911) c.171C>T (rs2228485)	c.*118C>A
a98	c.-485T>C			

3 Ergebnisse

3.2.1 Kurze Darstellung möglicherweise pathogener Basensubstitutionen Im Gen OXTR (NM_000916.3⁶³)

Veränderungen im Bereich der 5'-untranslatierten Region

Exon 01 (c.-551C>T; rs2301260⁷³)

Ein Austausch von Cytosin durch Thymin an Position -551 (c.-551C>T) trat bei 8,6% der Patientinnen-DNA-Isolate (acht Proben) und einer Kontrolle (c134903) auf. Es handelt sich hierbei um einen bereits bekannten und in der Online-Datenbank dbSNP verzeichneten Single Nucleotide Polymorphism (SNP; rs2301260⁷³), dessen Minor Allel Frequency (MAF) mit 0,118⁷³ angegeben wird. Das bedeutet, eine Substitution von Cytosin durch Thymin zeigte sich in der im Zuge des groß angelegten genomweiten Sequenzierprojekts 1000Genomes (2504 Probanden; Browser Update vom Oktober 2014⁷⁴) untersuchten Studienpopulation mit einer Häufigkeit von 11,8%, sodass von einer apathogenen Variante ausgegangen werden kann; die Analyse des SNP mithilfe des European Variation Archive bestätigt diese Einschätzung.⁷⁵

Exon 03 (c.-133A>C)

Weiterhin konnte an Position -133 innerhalb des Exons 03 im DNA-Isolat zweier MRKH-Patientinnen (Probe a91, 92) ein Ersatz von Adenin durch Cytosin (c.-133A>C) detektiert werden. Diese Basensubstitution wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit beschrieben und ist dementsprechend weder in dbSNP⁷³ noch in 1000 Genomes⁷⁴ aufgeführt.

3 Ergebnisse

Basenaustausch im Bereich der Aminosäure-codierenden Region

Exon 03 (c.712G>A; rs61740241⁷³)

Ebenfalls in Exon 03 des OXTR-Gens fand sich an Position 712 ein Ersatz von Guanin durch Adenin (c.712G>A) bei 8,6% aller eingesetzten DNA von MRKH-Patientinnen (acht Proben). Der Basenaustausch trat in sieben Fällen heterozygot und bei nur einer Probe homozygot auf. Diese Substitution entspricht einem bereits bekannten SNP (rs61740241⁷³), dessen MAF in dbSNP mit 0,013⁷³ angegeben wird. Als Folge der beschriebenen Sequenzänderung wird an Position 238 der resultierenden Aminosäuresequenz Alanin durch Threonin ersetzt.^{73,75,76} Dieser Aminosäureaustausch wird von PolyPhen2, der Software zur Vorhersage von Effekten eines Basenaustauschs auf die Proteinfunktion jedoch als benigne eingestuft – der zugeordnete Pathogenitätsscore liegt bei einer Spanne zwischen 0 (nicht pathogen) und 1 (hohe Wahrscheinlichkeit für Pathogenität) bei nur 0,002.⁷⁷

3.3 Ergebnisse der Sequenzanalyse des Gen für den Östrogenrezeptor α (ESR1; NM_0011227421⁶³)

ESR1 (NM_0011227421⁶³), das für den Östrogenrezeptor α codierende Gen, liegt auf Chromosom 6, Position 151.690.496 - 152.103.274⁷¹ des Vorwärtsstrangs (Plusstrang); seine Länge beträgt 412.778 bp. Das Gen umfasst zehn Exons, davon sind sieben Teil der Aminosäure-codierenden Region. Die Exons 01, 02 und ein Teil von Exon 03 bilden die 5'-UTR, die 3'-UTR wird durch Exon 10 repräsentiert.⁷²

Die nachstehende Tabelle enthält die Exonkoordinaten von ESR1 auf Chromosom 6 entsprechend Transkript ENST00000440973,⁷¹ die Positionen der für die PCR eingesetzten Primer, sowie die Größe der resultierenden Amplifikate.⁶⁴ Exon 03 und 10 mussten aufgrund ihrer Länge von >400bp für die PCR in mehrere Fragmente zerlegt werden.

3 Ergebnisse

Tabelle 8 Exonkoordinaten von ESR1 (NM_0011227421⁶³) entsprechend des Transkripts ENST00000440973⁷¹

Exon	Größe	5'-Exongrenze	3'-Exongrenze	Start 5'-Primer/ Primergröße	Start 3'-Primer/ Primergröße	Amplifikatgröße
01	169bp	151.690.496	151.690.664	151.690.438/20bp	151.690.705/27bp	295bp
02	131bp	151.701.875	151.702.005	151.701.816/23bp	151.702.078/22bp	274bp
03 1	261bp	151.807.843		151.807.708/18bp	151.808.221/20bp	533bp
03 2	261bp		151.808.364	151.808.048/20bp	151.808.541/20bp	525bp
04	191bp	151.842.597	151.842.787	151.842.523/20bp	151.842.927/22bp	427bp
05	117bp	151.880.655	151.880.771	151.880.598/22bp	151.880.825/20bp	248bp
06	336bp	151.944.173	151.944.508	151.944.075/25bp	151.944.606/21bp	505bp
07	139bp	152.011.656	152.011.794	152.011.566/21bp	152.011.915/18bp	386bp
08	134bp	152.060.991	152.061.124	152.060.833/24bp	152.062.190/20bp	378bp
09	184bp	152.094.385	152.094.568	152.094.323/21bp	152.094.616/20bp	314bp
10 1	378bp	152.098.732		152.098.665/19bp	152.099.154/19bp	508bp
10_2 - 10_12	4158bp		152.103.274			

Zu den Sequenzen der einzelnen Primer siehe Tabelle im Anhang.

Bei der Sequenzanalyse aufgefallenen Basensubstitutionen sind in Übersicht in der folgenden Tabelle in cDNA-Notation (siehe auch 3.2) aufgeführt. Nicht hervorgehobene Basenveränderungen sind als häufig auftretende Varianten ohne pathogenen Effekt zu werten; kursiv notierte Stellen erforderten eine detaillierte Untersuchung, sind aber eher als nicht relevant für die Ätiogenese des MRKH-Syndroms einzustufen, während fett gedruckte SNPs als diskussionswürdig und als möglicherweise mitursächlich für das MRKH-Syndrom angesehen werden können.

Durch Unterstreichen gekennzeichnet sind Sequenzanteile, deren Amplifikation bzw. Sequenzierung nicht erfolgreich war; sie wurden deshalb in der Ergebnisauswertung nicht berücksichtigt.

3 Ergebnisse

Tabelle 9 Bei Sequenzanalyse von ESR1 (NM_001122742⁶³) detektierte Basenveränderungen
 (nicht hervorgehoben - *apathogene, häufige Varianten*
kursiv - eher nicht relevant für die Ätiogenese des MRKH-Syndroms
fett - diskussionswürdige, möglicherweise pathogene Varianten
unterstrichen - Sequenzteile fehlen)

rs-Nummern aus der Datenbank dbSNP⁷³

Patientinnenprobe	Ex01	Ex02	Ex03	Ex04	Ex05	Ex06	Ex07	Ex08	Ex09	Ex10_1
c134503										
c134504										
c134903					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
c134904					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a01			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a02			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a03					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a04			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a05			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a06			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a07			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.805C>T (rs142712646) c.975G>C (rs1801132)				
a08			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a09			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a10	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a11					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a12			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a13			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a14			c.30T>C (rs2077647) c.332T>G c.352T>C (rs200075329)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a15					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a17			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a18			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a19					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a20			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a21			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a22			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a23			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480) c*96C>T (rs9341070)
a24			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a25			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a26			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a27	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a28			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a29	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)					
a30			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a31	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a32			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a33			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a34	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a35			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a36					c.729T>C (rs4986934)					c.1782G>A (rs2228480)
a37					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a38			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a40	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a41					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a43					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a44	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a46	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a47	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a48			c.30T>C (rs2077647)		c.720C>T (rs200303616) c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a49	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a50	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a51					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a52			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a53	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a54			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)

3 Ergebnisse

a55	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a56	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a57	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a58	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a59	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432) Ex03_2 fehlt	fehlt	fehlt	fehlt				fehlt
a60	IVS1 -19insG		c.16C>T (rs139960913) c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a62	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)					
a63					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a64			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a65					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a66			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a67			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a68					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a69			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a70			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a71			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a72					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a73	c.-314A>T		c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a74	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)					
a75			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a76					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a77			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a78	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a79	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)	c.1131C>T (rs61760169)			c.1782G>A (rs2228480)
a80	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a81	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a82	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a83			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a84			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a85			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a86			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)					
a87	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a88	IVS1 -19insG				c.650A>G c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a89					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a90	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a91					c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)
a92			c.30T>C (rs2077647) c.261G>C (rs746432)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a93			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a94	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a95	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				

3 Ergebnisse

a96	IVS1 -19insG				c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a97	IVS1 -19insG		c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				
a98			c.30T>C (rs2077647)		c.729T>C (rs4986934)	c.975G>C (rs1801132)				c.1782G>A (rs2228480)

3 Ergebnisse

3.3.1 Übersicht über näher untersuchte Sequenzveränderungen im Gen ESR1 (NM_0011227421⁶³)

Sequenzveränderungen im Bereich der Aminosäure-codierenden Region

Exon 03 (c.261G>C; rs746432⁷³)

An Position 261 innerhalb von Exon 03 des Gens ESR1 zeigte sich im Vergleich zur Referenzsequenz aus Ensembl ein Basenaustausch von Guanin zu Cytosin (c.261G>C). Die Variante ist bereits als Single Nucleotide Polymorphism (SNP; rs746432⁷³) in der Datenbank dbSNP verzeichnet und konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei 17% der Patientinnen-DNA (16 Proben) gefunden werden. Diese Punktmutation auf DNA-Ebene führt jedoch aufgrund der Redundanz des humanen genetischen Codes nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und beeinträchtigt somit die Proteinfunktion nicht.^{75,76}

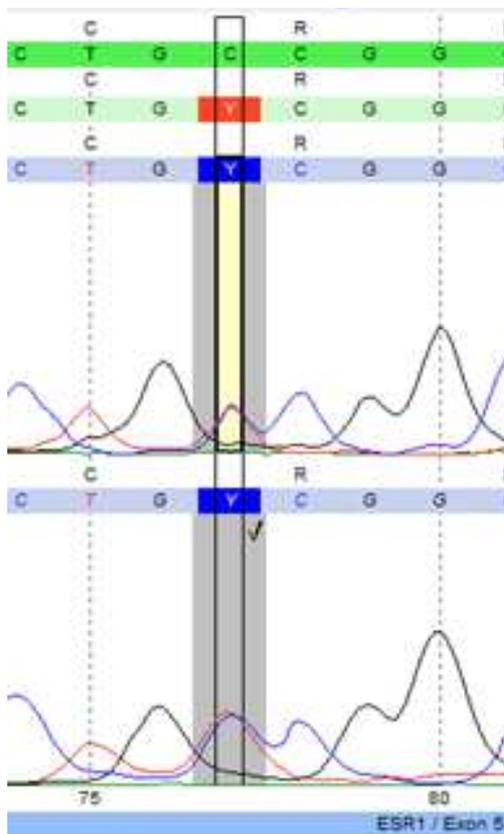
Exon 03 (c.352T>C; rs200075329⁷³)

Im DNA-Isolat der Patientinnen-Blutprobe a14 fand sich ein weiterer bereits bekannter SNP (rs200075329⁷³). An Position 352 in Exon 03 des Gens ESR1 konnte ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin (c.352T>C) detektiert werden. In der europäischen Bevölkerung tritt diese Punktmutation mit einer MAF von 0,0033⁷³ auf. Auf Aminosäureebene resultiert aus dem beschriebenen Basenaustausch ein Ersatz von Serin durch Prolin an Position 118. Im European Variation Server ist die Variante dementsprechend als Missense Mutation beschrieben.⁷⁵ Da aber unter physikochemischen Gesichtspunkten zwischen den beiden ausgetauschten Aminosäuren nur ein geringgradiger Unterschied besteht,⁷⁶ wird der gefundene Basen- bzw. Aminosäureaustausch von PolyPhen2 als nicht pathogen eingestuft (Score 0,039).⁷⁷

3 Ergebnisse

Exon 05 (c.720C>T; rs200303616⁷³)

Auch der Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 720 (c.720C>T) innerhalb von Exon 05 (gefunden bei Probe a48) zählt zu den bereits in dbSNP verzeichneten SNPs (rs200303616⁷³). Diese Punktmutation verändert die Aminosäuresequenz nicht,⁷⁵ die sich ergebenden alternativen Tripletts TGC bzw. TGT codieren beide für Cystein.⁷⁶ In der europäischen Bevölkerung findet sich allerdings zu 99,9% Cytosin an Position 720 des ESR1 und nur in 0,1% Thymin.⁷³



Adenin - grün; Cytosin - blau;
Guanin - schwarz; Thymin - rot

Abbildung 8 Darstellung der bei Probe a48 in Exon 05 heterozygot aufgetretenen Basensubstitution c.720C>T.

Der erste, intensiv grün gefärbte Balken zeigt die Basenfolge der Referenzsequenz.

In blau findet sich das Ergebnis der Sequenzierung in forward (oberer Balken) sowie reverse (unterer Balken) Richtung.

Der hellgrüne, zweite Balken zeigt für die jeweilige Position die Mischkalkulation aus beiden Sequenzierrichtungen an.

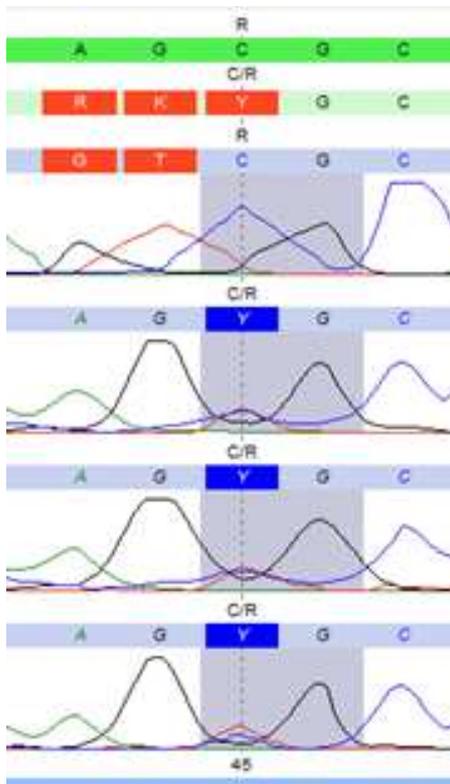
Die Zahlen beschreiben die Position der jeweiligen Base innerhalb des Exons und differieren daher von der cDNA-Notation.

(SeqPilot Vers. 4.1.2)

3 Ergebnisse

Exon 06 (c.805C>T; rs142712646⁷³)

Eine weitere Veränderung der Basensequenz, die allerdings durchaus als pathogen einzustufen ist, fand sich bei DNA-Isolat a07 an Position 805 in Exon 06. Hier wurde statt der Base Cytosin Thymin als Ergebnis der Sequenzierung ausgelesen (c.805C>T). Nur 0,3% der europäischen Bevölkerung zeigen diesen in dbSNP bereits aufgeführten Polymorphismus (rs142712646⁷³). Der Basenaustausch betrifft eine hoch konservierte genetische Region und führt dazu, dass die Aminosäure Arginin an Position 269 der Aminosäuresequenz durch Cystein ersetzt wird, wobei zwischen diesen beiden Aminosäuren große physikochemische Unterschiede bestehen. Dementsprechend kalkuliert PolyPhen2 die beschriebene Basenveränderung als höchstwahrscheinlich krankheitsverursachend, der Pathogenitätsscore auf der Skala von 0 - 1 liegt bei 1,0.^{75,77}



Adenin - grün; Cytosin - blau;
Guanin - schwarz; Thymin - rot

(Bildmaterial aus SeqPilot Vers.4.1.2)

Abbildung 9 Darstellung der bei Probe a07 in Exon 06 heterozygot gefundenen Basensubstitution c.805 C>T. Der erste, intensiv grün gefärbte Balken zeigt die Referenzsequenz. Blau dargestellt sind die Ergebnisse einer qualitativ weniger hochwertigen Sequenzierung in forward Richtung (daher zwei weitere rot unterlegte Basen; oberer blauer Balken) sowie dreier Sequenzierungen in reverse Richtung (folgende blaue Balken; die letzte Sequenz zeigt die beste Qualität). In hellgrüner Farbe ist wiederum die Mischkalkulation aus allen Sequenzierungen abgebildet. Die Zahlen entsprechen der Position der Basen innerhalb des Exons.

3 Ergebnisse

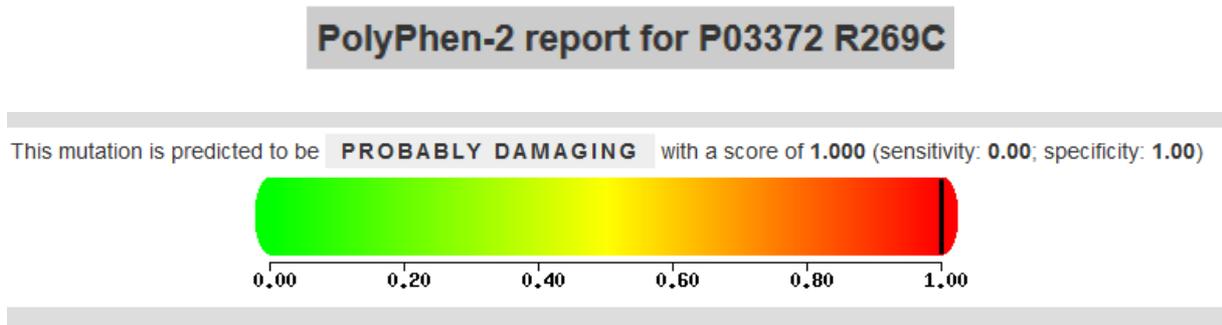


Abbildung 10 Von der Analysesoftware PolyPhen2 kalkulierter Pathogenitätsscore des bei Probe a07 in Exon 06 heterozygot aufgetretenen SNP c.805C>T.⁷⁷ Aus der Skala von 0 (benigne Mutation) bis 1,0 (pathogene Basensubstitution) ergibt sich der Verdacht auf einen relevanten, möglicherweise krankheitsverursachenden Effekt des genannten SNP.

Exon 07 (c.1131C>T; rs61760169⁷³)

In Exon 07 von ESR1 konnte an Position 1131 noch ein Austausch von Cytosin durch Thymin (c.1131C>T) bei einer MRKH-Patientinnen-Probe (a79) festgestellt werden. Es handelt sich hier wiederum um einen in dbSNP verzeichneten SNP (rs61760169⁷³); durch die Redundanz des humanen genetischen Codes resultiert aus der beschriebenen Basenveränderung kein Aminosäureaustausch.^{75,76} Die alternativen Triplets CAC bzw. CAT codieren entsprechend der Codesonne (siehe Anhang) beide für Histidin.

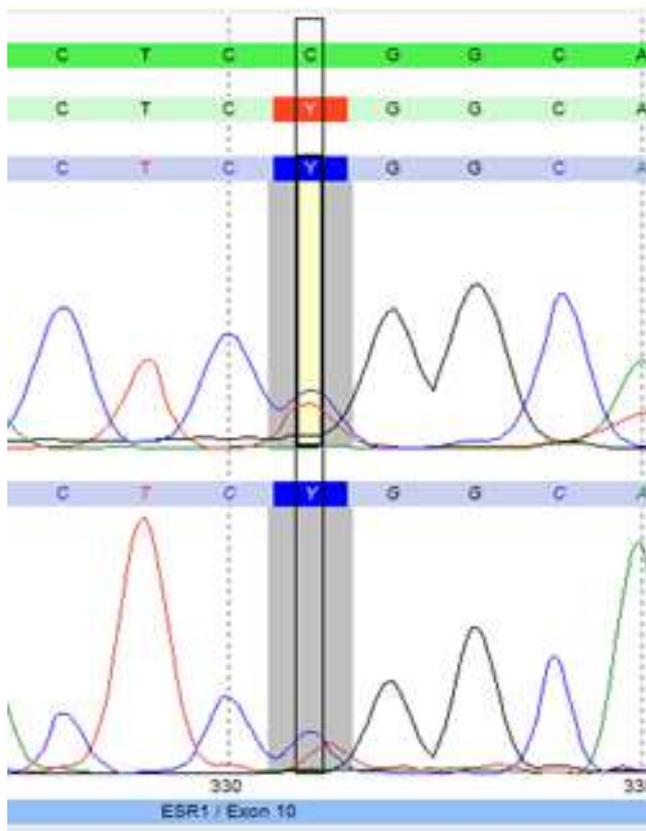
Sequenzalterationen im Bereich der 3'-untranslatierten Region

Exon 10 (c.*96C>T; rs9341070⁷³)

Im DNA-Isolat der Blutprobe a23 zeigte sich an Position *96 des zehnten Exons, das bereits zur 3'-UTR zählt,⁷⁵ eine Substitution von Cytosin durch Thymin (c.*96C>T). Es handelt sich bei diesem Basenaustausch um einen bekannten und in dbSNP hinterlegten Polymorphismus (rs9341070⁷³), der bei 0,8% der

3 Ergebnisse

europäischen Bevölkerung zu finden ist⁷³ und als Bindestelle der miRNA-206 beschrieben wurde.⁷⁸



Adenin - grün; Cytosin - blau;
Guanin - schwarz; Thymin - rot

Abbildung 11

Darstellung des bei Probe a23 in Exon 10 und somit im Bereich der 3'-UTR heterozygot detektierten SNP c.*96C>T.

Der oberste intensiv grün gefärbte Balken stellt die Referenzsequenz dar. In blauer Farbe jeweils die Ergebnisse der Sequenzierung in forward- (dritter Balken) und reverse- (vierter Balken) Richtung. Hellgrün hinterlegt findet sich die Mischkalkulation der beiden Sequenzierergebnisse. Die Zahlen beziehen sich auf die Position innerhalb des Exons.

(Bildmaterial aus SeqPilot Vers.4.1.2 übernommen)

4 Diskussion

Die Ätiogenese des MRKH-Syndroms, einer embryonalen Fehlbildung der Müllergänge mit resultierender Aplasie bzw. Dysplasie des Uterus und der oberen zwei Drittel der Vagina, gilt nach jetzigem Forschungsstand als noch unzureichend geklärt. Allerdings deuten gerade auch Studien aus jüngerer Zeit^{17,35,42,47} auf eine ursächliche Beteiligung von Hormonrezeptoren an der Entstehung des MRKH-Syndroms hin. Dementsprechend prüft die vorliegende Arbeit ein Auftreten von Sequenzveränderungen in den beiden für Hormonrezeptoren kodierenden Genen ESR1 und OXTR bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom. Dazu erfolgte erstmals eine Sequenzanalyse der betreffenden Gene an DNA-Isolaten aus Blutproben von 93 Patientinnen, hinterlegt in der umfangreichen Blut- und Gewebekbank der Universitätsfrauenklinik, Tübingen. Im Vergleich mit DNA gesunder Kontrollen (CEPH-DNA) und einer aus der Datenbank Ensembl entnommenen Referenzsequenz⁷⁹ ließen sich bei Betroffenen insbesondere im Gen des Östrogenrezeptors α Veränderungen der Basensequenz detektieren, die potenziell die Funktion dieses Hormonrezeptors beeinträchtigen könnten. In Zusammenschau mit bereits zuvor am östrogenrezeptordefizienten Mausmodell nachgewiesener Uterusdysplasie und auf Östrogene nicht ansprechender Uterusepithelien¹⁸ erhärtet sich die Annahme, Mutationen im Gen ESR1 könnten entscheidenden Einfluss auf die Genese eines MRKH-Syndroms haben.

4.1 Anmerkungen zu den angewandten Methoden

Sowohl die DNA-Isolation aus Blutleukozyten (siehe 2.10.2/3) als auch die Touchdown-PCR⁶⁸ (siehe 2.10.4) zählen wie die kapillarelektrophoretische Sequenzierung auf Grundlage der Sanger-Methode⁸⁰ (siehe 2.10.7-9) zu den etablierten und vielfach eingesetzten laborchemischen Verfahren. Fehlerhafte Ergebnisse sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit daher nahezu ausschließlich im Zusammenhang mit menschlichem Versagen bzw.

4 Diskussion

technischen Defekten zu erwarten gewesen; ein besonders sorgfältiges Vorgehen sowie die regelmäßige Überprüfung und Wartung der verwendeten Geräte sollte das Risiko verfälschter Resultate auf ein Minimum reduzieren.

Darüber hinaus wurden, um die erfahrungsgemäß jeweils zu Beginn und Ende eines DNA-Fragments auftretende Problematik eines Hintergrundrauschens und somit einer ungenauen Auslesung der generierten Sequenzen zu umgehen, die eingesetzten Oligonukleotid-Primer (siehe 2.2) jeweils mit einem Abstand von 20bp zum Exonbeginn positioniert. Auf diese Weise war die exakte Analyse der kompletten exonischen DNA ohne Verluste möglich.

Als einziger kritischer Punkt muss der Vergleich zwischen Referenzsequenz bzw. Sequenz der Kontroll-(CEPH-)DNA und Basenfolge der DNA-Isolate der untersuchten MRKH-Patientinnen genannt werden. Unter Zuhilfenahme des Programms SEQ-Pilot Vers.4.1.2 erfolgte der Basenabgleich per Augenmaß. Um dennoch objektive, valide und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und wissenschaftlich fundierte Aussagen treffen zu können, wurde innerhalb des Programms eine Statistik eingerichtet, die eine wertende Beurteilung gefundener Sequenzunterschiede ermöglicht. Dazu wurde an jeder Position für die jeweils dargestellte Base über alle Proben hinweg die durchschnittliche Höhe des Ausschlags in der Sequenzgrafik (siehe z.B. Abbildung 8) ermittelt und als Säulendiagramm dargestellt. Anschließend konnten im Vergleich signifikante Änderungen der Ausschlagshöhe leichter von unbedeutenden Schwankungen unterschieden werden. Zur Verdeutlichung des analytischen Vorgehens finden sich im Folgenden jeweils ein Beispiel einer signifikanten Basenveränderung und eines Artefakts in grafischer Darstellung.

4 Diskussion

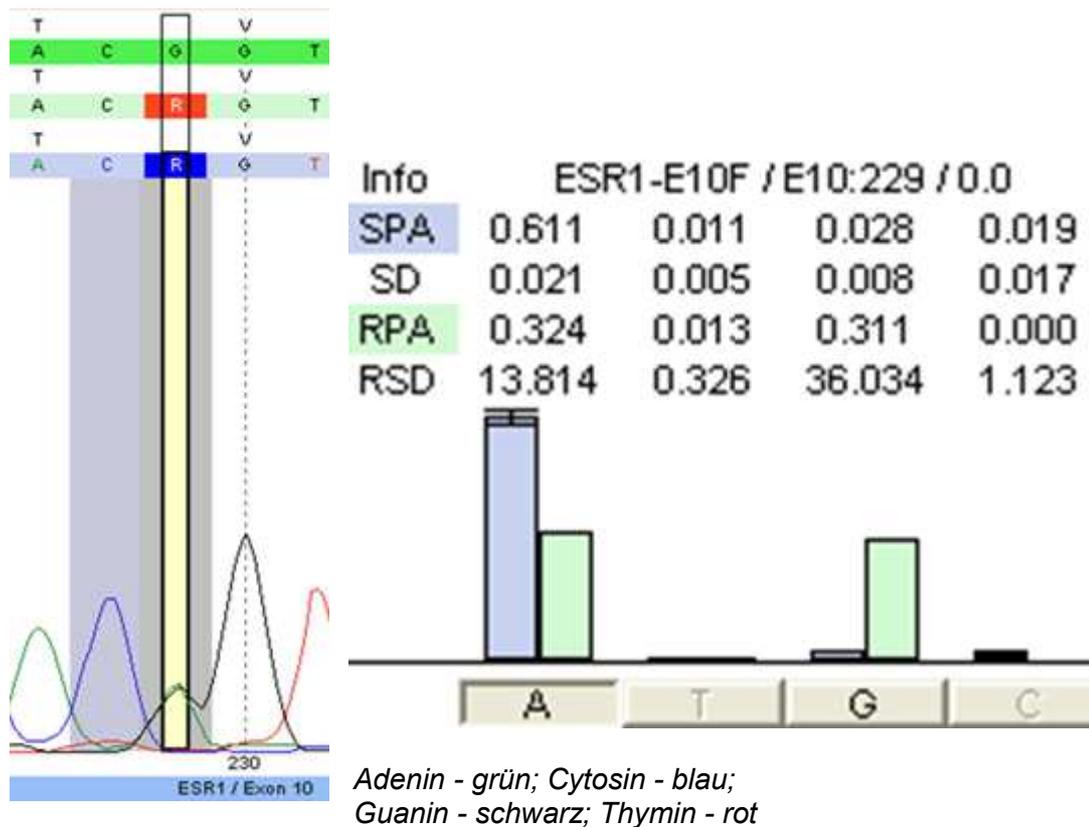


Abbildung 12 Beispiel einer heterozygoten Basenveränderung in Exon 10 Position 229 des Gens ESR1 (Probe a14)

Im Säulendiagramm blau dargestellt und als Zahlenwert unter Statistic Peak Area (SPA) aufgeführt, findet sich für die jeweilige Base die durchschnittliche Höhe des Ausschlags im Elektropherogramm bezogen auf alle analysierten Proben. Die zugehörige Standardabweichung findet sich in Zeile SD (Standard Deviation). An Position 229 von ESR1 wäre folglich die Base Adenin(A) zu erwarten gewesen. Thymin(T), Guanin(G) sowie Cytosin (C) sind in Zusammenschau aller Proben an dieser Position nur als marginales Hintergrundrauschen aufgetreten.

Der grün dargestellte, bei Probe a14 vorgefundene Ausschlag für Adenin (entsprechender Zahlenwert unter Result File Peak Area(RPA)) ist im Vergleich mit dem Durchschnittswert über alle Proben etwa um die Hälfte reduziert; ein zusätzlicher Peak ist für Guanin festzustellen. Das Ausmaß der Differenz zwischen SPA und RPA ist in Zahlen nochmals unter Relative Standard Deviation (RSD) abzulesen.

(Bildmaterial aus SeqPilot Vers.4.1.2)

4 Diskussion

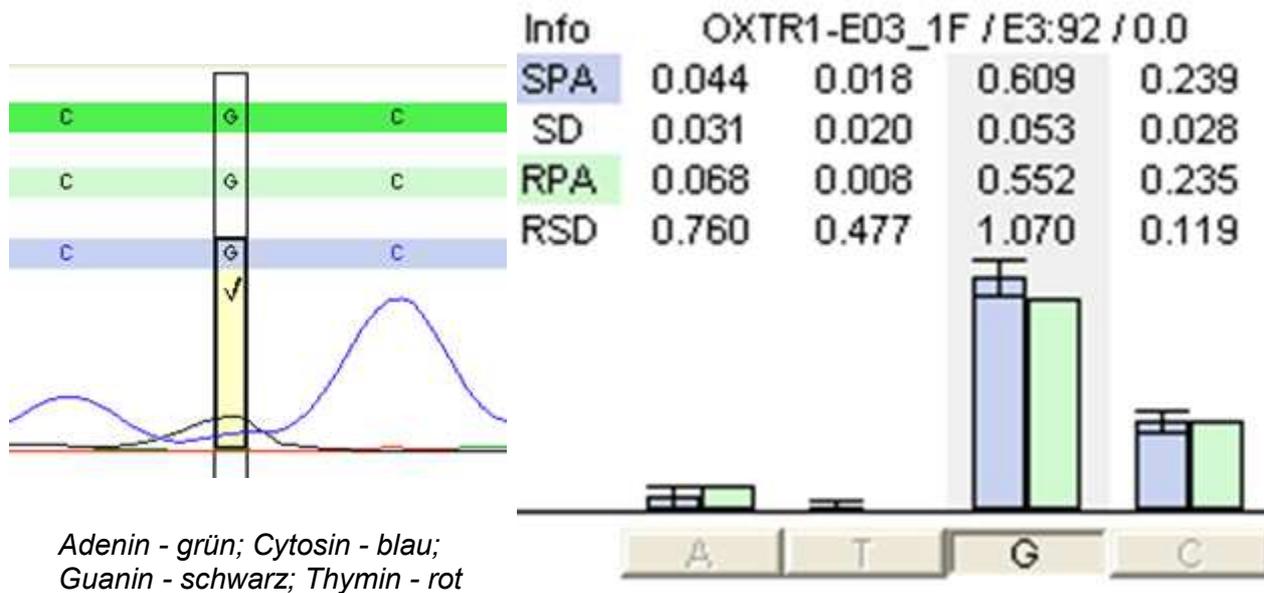


Abbildung 13 Beispiel eines Artefakts in Exon 03_1 Position 92 des Gens OXTR
(Probe a01)

Im Säulendiagramm blau dargestellt bzw. als Zahlenwert unter Statistic Peak Area (SPA) die durchschnittliche Ausschlagshöhe der Base im Elektropherogramm kalkuliert über alle analysierten Proben. In Zeile SD (Standard Deviation) findet sich die jeweils zugehörige Standardabweichung.

Die grüne Säule bzw. der Wert der Result File Peak Area (RPA) zeigen, dass bei Probe a01 an Position 92 zwar zusätzlich zur Referenzbase Guanin (G) ein deutlicher Ausschlag für Cytosin zu verzeichnen ist, doch ist diese Konstellation so auch bei anderen Proben aufgetreten (blaue Säule über C). Zudem findet sich im Vergleich mit allen analysierten Proben keine über die Standardabweichung hinausgehende Reduktion der Originalbase Guanin(G). Die Differenz zwischen SPA und RPA, aufgeführt als Relative Standard Deviation (RSD) ist dementsprechend auch gering (<1) Ein deutliches Hintergrundrauschen ist bei Probe a01 zudem für Adenin (A) zu verzeichnen, was die These eines Artefakts weiter unterstützt. Nur Thymin (T) war an Position 92 nicht auszulesen.

(Bildmaterial aus SeqPilot Vers.4.1.2)

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Bedeutung der im Gen OXTR (NM_0009163⁶³) detektierten Sequenzveränderungen c.-551C>T (rs2301260⁷³), c.-133A>C und c.712G>A (rs61740241⁷³)

Eine Beteiligung des G-Protein-gekoppelten Oxytozinrezeptors (OT-R) an der Embryonalentwicklung des weiblichen Genitaltrakts ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Seine Funktion im Bereich der femininen Geschlechtsorgane liegt bei Bindung des Peptidhormons Oxytozin in der Einleitung der Geburt durch Stimulation von Uteruskontraktionen, die ein Austreiben der Frucht bewirken, sowie in der Induktion einer Kontraktion myoepithelialer Milchgangszellen der weiblichen Brust im Rahmen der Lactation.⁸¹ Bemerkenswert ist darüber hinaus eine Expression von Oxytozinrezeptoren im Bereich der Macula densa und juxtamedullärer Nephrone im Nierengewebe von Ratten⁸² ebenso wie in deren Herzvorhöfen bzw. -ventrikeln.⁸³ Im Hinblick auf mögliche kardiale bzw. renale Malformationen im Assoziationsspektrum eines MRKH-Syndroms vom Typ II kann eine Beteiligung an der Entstehung dieses komplexen Fehlbildungssyndroms also durchaus in Betracht gezogen werden. Gewichtigeres Argument für eine Mutationsanalyse von OXTR im Rahmen der vorliegenden Arbeit war jedoch die von Rall *et al.* beschriebene reduzierte Expression dieses Gens im rudimentären Uterusgewebe von Patientinnen mit MRKH-Syndrom im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe.⁴² Eine Punktmutation im uterin exprimierten Gen OXTR, die im Sinne einer Nonsense-Mutation zu einem verfrühten Stop-Codon und somit einem die Rezeptorfunktion beeinträchtigenden Kettenabbruch der Aminosäuresequenz führen würde, bot sich als Erklärungsmodell für eine Ausbildung rudimentärer und nicht funktionsfähiger Uteri an. Die Auswertung der vorliegenden Sequenzanalyse von OXTR an DNA von Patientinnen mit MRKH-Syndrom und einigen gesunden Kontrollen konnte das Auftreten einer solchen Mutation als ätiogenetische Erklärung dieses Fehlbildungssyndroms allerdings nicht bestätigen. Im Bereich der codierenden Sequenz konnte bei keiner der 92

4 Diskussion

vollständig sequenzierten Patientinnenproben eine die Proteinfunktion beeinträchtigende Basenveränderung detektiert werden. Innerhalb der Aminosäure-codierenden Region fand sich einzig ein bereits beschriebener SNP, die Substitution von Guanin durch Adenin an Position 712 des OXTR (c.712G>A; rs61740241⁷³). Der resultierende Austausch der Aminosäure Alanin durch Threonin scheint die Funktionsfähigkeit des Oxytozinrezeptors aufgrund ähnlicher physikochemischer Eigenschaften beider Aminosäuren jedoch nicht zu beeinträchtigen. Dem entspricht die Einstufung des SNPs als benigne Variante durch PolyPhen2. Zusätzliche Bestätigung findet diese Bewertung der beschriebenen Basensubstitution durch Befunde einer Sequenzanalyse von OXTR im Rahmen einer Studie zur Ätiogenese des Autismus, die diesen SNP bei Betroffenen ebenfalls detektierte und genauso als für die Rezeptorfunktion irrelevant deklarierte.⁸⁴

Dennoch lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht ausschließen, dass Sequenzalterationen im Gen des Oxytozinrezeptors für die Entstehung des MRKH-Syndroms eine Rolle spielen könnten. Die im Bereich der 5'-UTR gefundenen Punktmutationen

c.-551C>T (rs2301260⁷³) und c.-133A>C (in dbSNP nicht aufgeführt⁷³) können nach heutigem Forschungsstand in ihrer Auswirkung auf die Rezeptorfunktion nur schwer eingeschätzt werden. Zwar sind die betroffenen Basen nicht Bestandteil Aminosäure-codierender Triplets und haben somit keinen direkten Einfluss auf die Proteinfunktion, eine regulatorische Bedeutung für die Expression des Gens OXTR bleibt aber denkbar. Möglicherweise handelt es sich bei den betroffenen Sequenzbereichen um Regionen der Negativkontrolle des Gens (so genannte Silencer), die zu einer herabgesetzten Transkription und Translation von OXTR führen. Diese These ließe sich insbesondere gut mit den Befunden der Expressionsanalyse von Rall *et al.*⁴² vereinbaren und stellt einen haltbaren Erklärungsansatz für eine reduzierte Expression von OXTR in rudimentären Uteri von MRKH-Patientinnen dar. Somit erscheint es weiterhin lohnenswert im Zusammenhang mit ätiogenetischer Forschung zum MRKH-Syndrom zumindest die 5'-UTR von OXTR in ihrer Funktion und Bedeutung für die Genexpression genauer zu untersuchen.

4 Diskussion

Nicht zu vernachlässigen ist schließlich der funktionelle Zusammenhang zwischen Östrogenen und der Expressionsrate des Oxytozinrezeptors (OT-R).⁸⁵ Versuche an ovariectomierten Ratten und Schafen zeigten einen Expressionsverlust des Oxytozinrezeptors bei fehlender Einwirkung von Östrogenen.⁸⁶ Vermutete Ursache ist ein palindromisches, inkomplettes Östrogen-responsives Element (ERE) im Bereich der dem OXTR-Gen vorgeschalteten Sequenz, das bei Analysen von Ratten-DNA detektiert werden konnte.⁸⁷ Wie genau die Interaktion vonstatten geht, bleibt jedoch noch zu klären.⁸⁶ Fest steht allerdings, dass auch beim Menschen unter steigenden Östrogenspiegeln gegen Ende der Schwangerschaft eine verstärkte Expression des Oxytozinrezeptors in Dezidua und Myometrium zu beobachten ist.⁸⁸ Eine Störung im Östrogenregelkreis, wie sie bereits mehrfach^{17,35,42,47} als ursächlich für das MRKH-Syndrom postuliert wurde und in den Ergebnissen der Sequenzanalyse von ESR1 im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Bekräftigung findet, kann folglich als Erklärung für eine reduzierte Expression von OXTR mit herangezogen werden.

4.2.2 Bedeutung der im Gen ESR1 (NM_0011227421⁶³) detektierten Sequenzveränderungen

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse von ESR1 sind durchaus als Bestätigung der Hypothese einer ursächlichen Beteiligung funktionsdefizienter Östrogenrezeptoren, konkret des Östrogenrezeptors α , zu interpretieren. Allerdings lassen die vorliegenden Resultate auch erahnen, wie komplex sich die Regulation hormoneller Rezeptoren im menschlichen Körper gestaltet und in welcher mannigfaltiger Art und Weise eine Beeinträchtigung ihrer Funktionsfähigkeit möglich ist. So konnten allein im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine Basensubstitution mit direkter Veränderung der Aminosäuresequenz als auch Punktmutationen mit nur indirekten Auswirkungen im Sinne einer Spleißstellenveränderung bzw. Veränderung der Bindestelle einer miRNA erhoben werden. Weitere Forschung wird nötig sein, um auch

4 Diskussion

andere Möglichkeiten z.B. der posttranskriptionellen Modifikation oder epigenetischen Regulation der Rezeptorfunktion miteinzubeziehen.

4.2.2.1 c.805C>T (rs142712646⁷³) - Polymorphismus mit direkter Auswirkung auf die Aminosäuresequenz

Im humanen Genom macht ein interindividueller Austausch einzelner Basen (SNPs) 90% der Sequenzveränderungen aus.⁸⁹ Man kann diese SNPs entsprechend ihrer Auswirkung auf die Proteinfunktion in intronische oder synonym kodierende SNPs, die die Funktion des Translationsprodukts Protein nicht beeinflussen, und nicht-synonyme SNPs (nsSNPs), die einen Aminosäureaustausch im entstehenden Protein nach sich ziehen, unterteilen. In vielen Fällen kann demnach von einem Zusammenhang zwischen einem die Proteinfunktion korrumpierenden, nicht-synonymen Basenaustausch und erblichen Erkrankungen ausgegangen werden.

Allerdings ist es nach derzeitigem Forschungsstand nicht eindeutig möglich, vorherzusagen, ob ein spezifischer Basen- bzw. Aminosäureaustausch tatsächlich die Proteinaktivität und -stabilität beeinflusst. Oftmals treten Divergenzen zum Beispiel zwischen unterschiedlicher Software zur Prognose der funktionellen Auswirkungen eines Basenaustauschs auf, die keine distinkte Einschätzung zulassen. Als Grundlage einer Interpretation der Sequenzierungsergebnisse im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente PolyPhen2, eine Internetsoftware, deren Schwerpunkt auf der Vorhersage von Effekten von nsSNPs liegt,⁷⁷ wobei eine Sensitivität der Prognose von 80% und eine Spezifität von 70,5% erreicht wird.⁹⁰

Mit dem Basenaustausch c.805C>T (rs142712646⁷³) in Exon 06 von ESR1 (siehe Abb. 9 S. 59) konnte in einer Probe (a07) eine Variante detektiert werden, die als nsSNP einzuordnen ist und zu einem Austausch von Arginin durch Cystein an Position 269 der Aminosäuresequenz des Östrogenrezeptors α führt. Östrogenrezeptoren zählen zu den nukleären Rezeptoren, die bei Bindung eines Liganden dimerisieren und als Transkriptions-aktivierender Faktor an palindromische Zielsequenzen (Estrogen-responsive-Elements,

4 Diskussion

EREs) der DNA im Zellkern binden.⁹¹ Ihre molekulare Struktur entspricht der vieler weiterer Steroidrezeptoren: Über eine koppelnde D-(Hinge-) Region ist das carboxyterminale Ende (im Falle von ER α 293 AS lang), das eine Ligandenbindestelle darstellt (AF₂ oder LBD-Region), mit der DNA-Bindedomäne (DBD, im Bsp. ER α 83bp lang) verknüpft. Im Anschluss findet sich das aminoternale Ende (NTD), welches bei ER α 180 AS lang ist und eine Liganden-unabhängige Aktivierungsstelle (AF₁) enthält,⁹² an die beispielsweise Koaktivatoren wie Steroid-Rezeptor-Ko-Aktivator 1 (SRC 1) anbinden können.⁹³

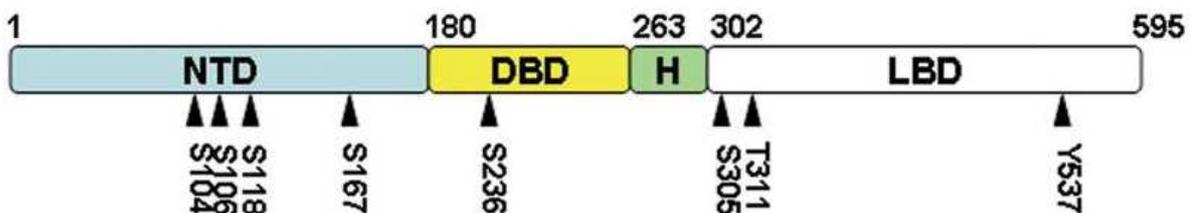


Abbildung 14 Struktur von ER α inklusive potenziell aktivierender Phosphorylierungsstellen (kleine Pfeile)
(die Zahlen entsprechen einer Nummerierung der Aminosäuren in aufsteigender Reihenfolge)⁹²

Demzufolge führt der im Rahmen der Sequenzanalyse von ESR1 aufgefallene nsSNP c.805C>T zu einer Aminosäuresubstitution im Bereich der Hinge- oder D-Region. Diese enthält die Signalsequenz zur Einschleusung der dimerisierten Rezeptoren in den Nucleus. Darüber hinaus stellt sie die Voraussetzung für das präzise Zusammenspiel der AF₁- und AF₂- Domäne dar, welches wiederum gemeinsam mit der Bindung spezifischer Koaktivatoren (bspw. SRC1) Grundlage einer adäquaten Rezeptorfunktion ist. Ein experimenteller Austausch der Hinge-Region von ER α mit der entsprechenden Region des trotz vielfacher Homologie weniger potenten ER β resultierte in einer verglichen mit dem Wildtyp reduzierten Antwort (geringere Expressionsrate im Luciferase-Assay) des Rezeptormutanten auf Östradiol.⁹³ Somit darf die Hinge-Region zu Recht als für die Funktion von ER α essenziell angesehen werden. Die Annahme, dass der

4 Diskussion

SNP c.805C>T, der in genau dieser Region von ER α zu einem Aminosäureaustausch führt, eine Funktionsbeeinträchtigung nach sich zieht, erscheint folglich gerechtfertigt. Ein zu diesen Überlegungen konformes Ergebnis erbrachte die Analyse des beschriebenen SNP mit der Prognosesoftware PolyPhen2. Ein Pathogenitätswahrscheinlichkeit von 100%⁷⁷ für c.805C>T stützt die These eines resultierenden defizienten Rezeptors ebenso wie die Tatsache, dass nur 0,3 % der europäischen Bevölkerung Träger dieses SNP sind.⁷³

4.2.2.2 c.720C>T (rs200303616⁷³) - Punktmutation mit Auswirkung auf den Spleißprozess

Wie bereits im Einleitungsteil (siehe 1.6.1) beschrieben, sind neben einer korrekten Basenfolge auf DNA-Ebene auch präzise co- bis posttranskriptionelle Modifikationen der prä-mRNA Voraussetzung für die volle Funktionsfähigkeit des entstehenden Proteins. Bestimmte hochkonservierte Basenfolgen determinieren, an welcher Stelle Introns exzidiert und die verbleibenden Exons ligiert werden (Spleißen). Ein Verlust von bzw. ein Auftreten zusätzlicher Spleißstellen kann in einer alternativen mRNA- Sequenz resultieren und auf diese Weise unter Umständen Aminosäuresequenz und Proteinfunktion negativ beeinflussen.

Bei Probe a48 fand sich in Exon 05 eine Substitution von Cytosin durch Thymin an Position 720 (rs200303616⁷³; siehe Abb. 8 S.58) Es handelt sich bei diesem Basenaustausch um einen synonymen SNP, da sowohl Triplet TGC als auch Triplet TGT entsprechend der Codesonne (siehe Anhang) für die Aminosäure Cystein codieren.

Die beschriebene Basensubstitution scheint allerdings Einfluss auf den posttranskriptionellen Spleißprozess der prä-mRNA von ESR1 zu haben: Thymin anstelle von Cytosin an Position 720 kann zum Auftreten einer alternativen Spleißstelle führen.⁹⁴

4 Diskussion



Abbildung 15 Darstellung der alternativen 5'-Spleißstelle durch die Basensubstitution c.720C>T in ESR1.

Zwei der abgefragten Spleißstellen-Prädiktorprogramme zeigen für die beschriebene Sequenzveränderung mit bis zu 78,0% Wahrscheinlichkeit ein alternatives Spleißen im Bereich der 5'-Spleißstelle an.⁷⁶

Die aus dem beschriebenen Basenaustausch c.720C>T resultierende Sequenz 5'...CCTGTGGC...3' enthält das hochkonservierte Dinukleotid GT, das häufig Bestandteil einer 5'-Spleißstelle und damit Kennzeichen einer Exongrenze ist.⁵¹ Eine 5'-Spleißstelle dient verschiedenen Ribonukleoproteinen als Erkennungssequenz und leitet ein Zusammenlagern des Spleißosoms ein, welches die Exzision des jeweiligen Introns und die Ligation der angrenzenden Exons katalysiert (siehe 1.6.1).

Vorausgesetzt, dass aus der Punktmutation c.720C>T eine alternative 5'-Spleißstelle resultiert, darf eine Beeinträchtigung der Proteinfunktion vermutet werden: Eine zusätzliche Binde- und somit Schnittstelle des Spleißosoms kann nicht nur zum Verlust exonischer Sequenzanteile führen, sondern unter Umständen das gesamte, auf die Spleißstelle folgende Leseraster alternieren, sodass differenziell codierende Basentriplets resultieren.

4 Diskussion

Im Fall der bei Probe a48 detektierten Substitution kann also trotz synonymen Basenaustauschs ein pathogener Effekt des SNP angenommen werden, insbesondere da die Mutation einen für die Funktion von ER α bedeutenden Bereich der DNA betrifft. Das von beiden alternativen Tripletts codierte Cystein liegt an Position 240 der Aminosäurekette und ist somit Bestandteil der DNA-bindenden Domäne (DBD) des Rezeptors (siehe Abb.13).⁹²

4.2.2.3 c.*96C>T (rs9341070⁷³) - Alteration einer miRNA-Bindungsstelle

Ob eine Sequenzveränderung im Bereich der nicht translatierten Region eines Gens die Proteinfunktion beeinflusst, kann bei heutigem Wissensstand nur für einzelne humane Gene beurteilt werden.

Die Funktion der 3'-UTR des Gens ESR1 wurde erfreulicherweise bereits offen gelegt: Sie ist für die Kontrolle der Stabilität der mRNA essenziell.⁹⁵ RNA-Transkripte aus Zellkulturen, die mit einem die 3'-UTR von ESR1 enthaltenden Plasmid transfiziert wurden, degenerierten bereits nach 3 - 4h. Die mRNA nicht transfizierter Zellen zeigte sich demgegenüber für 24h stabil. Allerdings konnte keine definierte Teilsequenz für den destabilisierenden Effekt verantwortlich gemacht werden, was eine Interaktion mit weiteren regulatorischen Elementen wahrscheinlich macht.⁹⁵

Es darf davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um eine Regulation durch MicroRNAs (miRNAs) handelt, da vergleichende Microarray-Analysen von miRNA-Konzentrationen in Östrogenrezeptor-negativem bzw. Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebsgewebe elf differenziell exprimierte miRNAs zeigen konnten.⁹⁶ Wie im Einleitungsteil bereits beschrieben, führt die Bindung einer miRNA an eine definierte Stelle der mRNA eines Gens zu deren Abbau oder verhindert zumindest die Translation und Proteinsynthese. Dementsprechend könnte die vermehrte Expression bestimmter miRNAs (miRNA-185,-206,-212)⁹⁶ im ER⁻ Brustkrebsgewebe die fehlende Expression des Östrogenrezeptors erklären. In einer weiteren Studie⁷⁸ konnten für die beim ER⁻ Mammakarzinom überexprimierte miRNA-206 zwei potenzielle Bindungsstellen innerhalb der 3'-UTR der ER α -mRNA detektiert werden.

4 Diskussion

Darüber hinaus ließ sich an Tumorzellen bestätigen, dass eine in-vitro-Zugabe von miRNA-206 die Synthese der mRNA des ER α sowie die Expression des Rezeptors reduziert.

Diese bei der Untersuchung von Östrogenrezeptor-negativen Brustkrebszellen gewonnenen Ergebnisse können unter der Annahme einer für die Ätiogenese des MRKH-Syndroms kausalen Defizienz des ER α im Sinne eines pathophysiologischen Modells interpretiert werden: Eine miRNA-Überexpression ist auch im Zusammenhang mit diesem Fehlbildungssyndrom als Ursache einer Östrogenrezeptorfehlfunktion denkbar. Erste Hinweise auf eine ätiogenetische Bedeutung von miRNAs sind mit der bereits erwähnten Expressionsanalyse⁶¹ an rudimentärem Uterusgewebe von Patientinnen bereits gegeben, die eine vermehrte Expression der miRNA-98, -145 und -203 im Vergleich zu Gewebe gesunder Kontrollen feststellen konnte.⁶¹

Bemerkenswert ist nun, dass der im Rahmen der vorliegenden Studie bei Blutprobe a23 gefundene SNP c.*96C>T (rs9341070⁷³; siehe Abb. 11 S.61) im Bereich einer der beiden experimentell für die miRNA-206 detektierten Bindungsstellen innerhalb der 3'-UTR von ESR1 lokalisiert ist und wohl die Effizienz der miRNA-Bindung beeinflusst: Der Austausch von Cytosin durch Thymin an Position *96 verstärkt wahrscheinlich die Bindung zwischen miRNA-206 und der 3'-UTR der mRNA des Östrogenrezeptors α und dadurch die Reduktion des Genprodukts: Eine Transfektion von HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) mit einer den SNP enthaltenden DNA zeigte bei Zugabe der miRNA-206 im Luciferase-Assay eine um das 2,2 - 3,6-fache reduzierte Expression der mRNA im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen.⁷⁸

Die Basensubstitution c.*96C>T alterniert folglich eine Bindungsstelle der miRNA-206 innerhalb der 3'-UTR von ESR1 dergestalt, dass die Bildung der mRNA und somit auch die Proteinsynthese, d.h. konkret die Synthese von Östrogenrezeptor α verringert ist.

Eine Punktmutation innerhalb der Gensequenz von ESR1, die in Konsequenz die Degeneration der mRNA des Gens durch verstärkte miRNA-Bindung beschleunigt, stellt eine völlig neue, jedoch mit einer bereits mehrfach

4 Diskussion

beschriebenen Reduktion der Expression des Östrogenrezeptors α ^{17,42,47} konforme Hypothese zur Ätiologie des MRKH-Syndroms dar, die weiterer Abklärung bedarf.

Sollte der SNP c.*96C>T tatsächlich für das MRKH-Syndrom kausal sein, dürfte unter Annahme eines autosomal-dominanten Erbgangs (siehe 1.5) kein gesundes Individuum existieren, in dessen Genom sich der beschriebene Polymorphismus nachweisen lässt. Das internationale HapMap-Projekt (siehe 1.6.3) bietet den weltweit größten Datensatz zur Verteilung von SNPs im Genom der menschlichen Spezies. Deshalb wurde das Auftreten des SNPs c.*96C>T in den im Rahmen dieses Forschungsvorhabens erhobenen Populationsdaten überprüft. Im Genom von 525 gesunden(!) Individuen amerikanisch-europäischer, nigerianischer, japanischer und chinesischer Abstammung konnte der betreffende SNP in der DNA zweier Probanden detektiert werden. Es handelt sich um Mitglieder der amerikanisch-europäischen Population, die in familiären Trios untersucht wurden. Die Daten lassen nachverfolgen, dass ein männliches Kind und seine Mutter Träger des SNP c.*96C>T sind.⁹⁷

Dieses Ergebnis scheint bei Annahme eines autosomal-dominanten Erbgangs zunächst offensichtlich im Widerspruch zur Hypothese einer kausalen Beteiligung des SNPs an der Ätiogenese des MRKH-Syndroms zu stehen. Allerdings gilt es zu beachten, dass für die Vererbung des MRKH-Syndroms auch variable Expressivität und unvollständige Penetranz postuliert wurden.^{4,27} Demzufolge könnte bei der betroffenen Mutter möglicherweise nur eine marginale uterovaginale oder renale Fehlbildung vorgelegen haben, die wegen fehlender gesundheitlicher Beeinträchtigung nicht zum Ausschluss von der Projektteilnahme geführt hat. Dies konnte leider nachträglich aufgrund der Anonymisierung der Daten nicht mehr eruiert werden. Auch das Auftreten des SNPs bei einem männlichen Nachkommen dieser Frau reicht nicht aus, um eine kausale Beteiligung am MRKH-Syndrom zu widerlegen, da sich ein Östrogenrezeptormangel beim männlichen Individuum nicht als Fehlbildung manifestiert, sondern eine Subfertilität hervorruft⁹⁸, die beim Kind kaum zu prüfen ist. Schließlich sind aufgrund der Infertilität der vom MRKH-Syndrom

4 Diskussion

schwerer betroffenen Patientinnen kaum vergleichbaren Daten zum Auftreten evtl. pathogener Mutationen in der Folgegeneration erhältlich. Einzelne Fallstudien zu In-vitro-Fertilisation (IVF) und Leihmutterschaft als Möglichkeit der Reproduktion bei MRKH-Patientinnen beschreiben allerdings Erfolgsraten von 45,5%⁹⁹ bzw. bis 50%¹⁰⁰ wobei bisher als einzige Fehlbildung ein unspezifischer Mittelohrdefekt beim Sohn einer MRKH-Patientin detektiert werden konnte⁹⁹. Alle weiteren durch IVF und Leihmutterschaft erzeugten Nachkommen wurden als gesund eingestuft. Das bedeutet wiederum, dass ein nicht betroffener Filius wie im HapMap-Datensatz verzeichnet, kein Ausschlusskriterium für eine MRKH-Erkrankung bei der Mutter darstellt. Somit konnte mit den Daten des HapMap-Projekts die Pathogenität des SNP c.*96C>T zwar nicht bestätigt, aber auch nicht eindeutig widerlegt werden.

5 Zusammenfassung/ Ausblick

Kennzeichen des MRKH-Syndroms, dessen Inzidenz unter weiblichen Neugeborenen immerhin bei 1:4500 liegt, sind eine Aplasie des Uterus und der oberen 2/3 der Vagina sowie fakultativ assoziierte renale, skelettale oder auch kardiale bzw. aurikuläre Fehlbildungen. Bis zum heutigen Tage ist die Ätiogenese dieses Fehlbildungssyndroms nicht vollständig bekannt, sodass ausschließlich symptomatisch therapiert, d.h. den Betroffenen zwar ein weitestgehend normaler Geschlechtsverkehr, aber keine natürliche Schwangerschaft ermöglicht werden kann. Eine Leihmutterschaft oder auch eine Uterustransplantation könnten hier Ansätze sein, den MRKH-Patientinnen ggf. den Wunsch nach eigenen Kindern zu erfüllen. Voraussetzung für den Erfolg solcher Methoden, der sich in gesunden Nachkommen widerspiegeln würde, ist jedoch nicht nur die technische Machbarkeit, die bereits heute gegeben ist, sondern eben vor allem die Kenntnis des Erbgangs des MRKH-Syndroms sowie das Wissen um molekulargenetische, epigenetische und möglicherweise weitere Faktoren, die diese komplexe Fehlbildung auslösen bzw. begünstigen.

Mit der erstmaligen systematischen Sequenzierung der Gene des Oxytozin- sowie des Östrogenrezeptors α bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollen soll diese Arbeit einen weiteren Baustein zur Klärung der Pathogenese des Krankheitsbildes beitragen und somit Grundlagen für neue therapeutische Ansätze liefern.

Hinweise auf eine kausale Beteiligung defizienter Hormonrezeptoren konnten bereits aus Vorgängerarbeiten^{17,35,42,47} entnommen werden; die vorliegenden Ergebnisse offenbaren erstmals Veränderungen auf DNA-Ebene, die über unterschiedliche molekulare Mechanismen die Funktion der betreffenden Rezeptorproteine beeinträchtigen könnten. Insbesondere die Sequenz von ESR1 zeigte in DNA-Isolaten von Patientinnen Einzelbasen-Polymorphismen (SNPs), die durch direkte Alteration der Aminosäuresequenz des

Rezeptorproteins, Beeinflussung posttranskriptioneller Vorgänge oder auch Veränderung einer miRNA-Bindestelle möglicherweise eine Fehlfunktion des Östrogenrezeptors α bedingen könnten. Aber auch die Analyse des Gens OXTR ließ eine Deutung der reduzierten Expression des Oxytozinrezeptors bei MRKH-Patientinnen⁴² im Sinne einer Störung im Östrogenrezeptor-Regelkreis als pathogenetische Erklärung zu.

Demzufolge erscheint im Hinblick auf eine Offenlegung der Ätiogenese des MRKH-Syndroms eine weitere Untersuchung der pathophysiologischen Bedeutung des Östrogenrezeptors α nebst dafür kodierendem Gen ESR1 viel versprechend. Die vorliegenden Ergebnisse sollen dabei als Anstoß dienen, neben klassischen Missense- bzw. Nonsense-Mutationen v.a. auch posttranskriptionelle Modifikationen und Regulationsmöglichkeiten als Ursache einer Rezeptordysfunktion in Betracht zu ziehen.

Ansatzpunkte sind hier vor allem die mutmaßliche Spleißstellen-Mutation in Exon 05 von ESR1 (c.720C>T; rs200303616) sowie die zusätzliche miRNA-Bindungsstelle in Exon 10 desselben Gens (c.*96C>T; rs9341070).

Um eine alternative Spleißstelle zu bestätigen, könnten aus EDTA-Blut der betroffenen Patientin a48 DNA und mRNA parallel isoliert und aus dem Abgleich beider Sequenzen Rückschlüsse auf den Spleißprozess gezogen werden. Ließe sich im Vergleich mit mindestens fünf Kontrollen auf diese Weise eine alternative Spleißstelle bestätigen, dürfte dies die Bedeutung nicht nur von ESR1 sondern auch von posttranskriptionellen Veränderungen für die Ätiologie des MRKH-Syndroms unterstreichen.

Die postulierte Beeinträchtigung der Östrogenrezeptorsynthese durch den bei Patientinnenprobe a23 aufgefallenen SNP c.*96C>T, der eine Bindestelle für die miRNA-206 darstellt,⁷⁸ könnte durch eine Expressionsanalyse von ESR1 im (bei der betroffenen Patientin vorhandenen) rudimentären Uterusgewebe verifiziert werden. Sollten die Expressionsraten im Patientinnengewebe deutlich zu Kontrollgewebe von Probanden, die nicht Träger dieses SNP sind, differieren, würde dies nicht nur den expressionsreduzierenden Effekt der miRNA-Bindestelle beweisen, sondern vor allem die Relevanz von Hormonrezeptoren für die Ätiogenese des MRKH-Syndroms erneut herausstellen.

6 Anhang

6.1 Anonymisierte Liste an der Studie beteiligter MRKH-Patientinnen

fortlaufende Nummerierung der Blutprobe im Rahmen der vorliegenden Arbeit	zugehörige Nummer in der Blut- und Gewebekbank der UFK Tübingen	assoziierte Fehlbildungen/ Nebendiagnosen	fortlaufende Nummerierung der Blutprobe im Rahmen der vorliegenden Arbeit	zugehörige Nummer in der Blut- und Gewebekbank der UFK Tübingen	assoziierte Fehlbildungen/ Nebendiagnosen
a01	MRKH-257-1	keine	a52	MRKH-149-1	Nierenfehlbildung
a02	MRKH-320-1	keine	a53	MRKH-142-1	keine
a03	MRKH-313-1	keine	a54	MRKH-185-1	keine
a04	MRKH-311-1	keine	a55	MRKH-181-1	keine
a05	MRKH-290-1	keine	a56	MRKH-191-1	keine
a06	MRKH-290-1	keine	a57	MRKH-095-1	keine
a07	MRKH-289-1	keine	a58	MRKH-135-1	keine
a08	MRKH-287-1	keine	a59	MRKH-192-1	keine
a09	MRKH-283-1	keine	a60	MRKH-189-1	keine
a11	MRKH-277-1	keine	a62	MRKH-206-1	keine
a12	MRKH-263-1	keine	a63	MRKH-209-1	keine
a13	MRKH-326-1	Adrenogenitales Syndrom	a64	MRKH-224-1	keine
a14	MRKH-323-1	keine	a65	MRKH-222-1	keine
a15	MRKH-318-1	Beckennieren	a66	MRKH-205-1	keine
a17	MRKH-293-1	MURCS-Assoziation	a67	MRKH-074-1	keine
a18	MRKH-291-1	keine	a68	MRKH-019-1	Beckenniere, zervikale Blockwirbelbildung, Hüftdysplasie rechts, Tenarhypoplasie rechts
a19	MRKH-260-1	keine	a69	MRKH-017-1	keine
a20	MRKH-267-1	keine	a70	MRKH-016-1	keine
a21	MRKH-275-1	keine	a71	MRKH-169-1	keine
a22	MRKH-274-1	keine	a72	MRKH-125-1	Beckenniere links
a23	MRKH-269-1	keine	a73	MRKH-009-1	keine
a24	MRKH-267-1	keine	a74	MRKH-172-1	keine
a25	MRKH-312-1	keine	a75	MRKH-156-1	keine
a26	MRKH-288-1	keine	a76	MRKH-118-1	Nierenfehlbildung
a27	MRKH-261-1	keine	a77	MRKH-008-1	keine
a28	MRKH-264-1	keine	a78	MRKH-006-1	keine
a29	MRKH-265-1	keine	a79	MRKH-015-1	keine
a30	MRKH-259-1	keine	a80	MRKH-078-1	Kleinwuchs
a31	MRKH-241-1	keine	a81	MRKH-002-1	malrotierte linksitzende Niere links, Nierenagenesie rechts, Hüftdysplasie, Minderwuchs, Kieferfehlstellung
a32	MRKH-243-1	keine	a82	MRKH-086-1	Beckenniere links
a33	MRKH-244-1	keine	a83	MRKH-064-1	Doppelnieren links
a34	MRKH-245-1	keine	a84	MRKH-070-1	Beckenniere links
a35	MRKH-246-1	keine	a85	MRKH-071-1	keine
a36	MRKH-248-1	keine	a86	MRKH-072-1	malrotierte Beckenniere links, Nierenagenesie rechts, Hüftdysplasie rechts, Skoliose
a37	MRKH-250-1	keine	a87	MRKH-056-1	Nierenaplasie rechts
a38	MRKH-254-1	keine	a88	MRKH-051-1	Malrotation Niere links
a40	MRKH-225-1	keine	a89	MRKH-042-1	Nierenaplasie rechts
a41	MRKH-226-1	keine	a90	MRKH-026-1	keine
a43	MRKH-170-1	Syndrom polyzystischer Ovarien	a91	MRKH-216-1	Nierenagenesie links
a44	MRKH-059-1	keine	a92	MRKH-200-1	Nierenagenesie rechts
a46	MRKH-109-1	Nierenagenesie links	a93	MRKH-010-1	Hypoplasie Os sacrum rechts
a47	MRKH-099-1	keine	a94	MRKH-035-1	Nierenfehlbildung
a48	MRKH-129-1	keine	a95	MRKH-105-1	Thoraxskoliose mit Blockwirbelbildungen
a49	MRKH-137-1	Nierenagenesie rechts	a96	MRKH-133-1	singuläre Beckenniere
a50	MRKH-143-1	keine	a97	MRKH-173-1	Herzdoppellumen, Hochtonschwerhörigkeit, Beckenschiefstand
a51	MRKH-150-1	keine	a98	MRKH-182-1	Nierenfehlbildung

6 Anhang

6.2 Liste verwendeter Primer für die Polymerasekettenreaktion (PCR)

6.2.1 Gen für den Oxytozinrezeptor (OXTR)⁶⁴

Type	Sequence name	Purification	Synthesis scale	Shipping Condition	Sequence
DNA	M422-OXTR-Ex1-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTTATTGACGAGTTCCTCC
DNA	M423-OXTR-Ex1-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaACCACCTCCACTCGGGTC
DNA	M424-OXTR-Ex2-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTGGTTTTAGATTCCCACTCC
DNA	M425-OXTR-Ex2-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCATCTGAAACAACAGGGCAC
DNA	M426-OXTR-Ex3-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgGTTCTGGGAATGGGACAAG
DNA	M427-OXTR-Ex3-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGTCGGCGATGCTTAGGTG
DNA	M428-OXTR-Ex3-F02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgCTGCTCCTGGCGCTGAG
DNA	M429-OXTR-Ex3-R02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGCGTGATCCATGTGATGAGG
DNA	M430-OXTR-Ex3-F03	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgAGGTGCACATCTTCTCTCTGC
DNA	M431-OXTR-Ex3-R03	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCAGCAAGATAAGGGCCTCC
DNA	M432-OXTR-Ex4-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgGATAGGTCTGGAAGTGGCTCC
DNA	M433-OXTR-Ex4-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCACTCTCCACCCCACTGAAG
DNA	M434-OXTR-Ex4-F02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgCTCTGCTCTAGGTGATGGC
DNA	M435-OXTR-Ex4-R02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGGCTACCCTCTGACAAGCTG
DNA	M436-OXTR-Ex4-F03	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTCTGGACTTGGGGTAAGCAG
DNA	M437-OXTR-Ex4-R03	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgatctgactgttttgaagtgtg
DNA	M438-OXTR-Ex4-F04	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtggaagttccgaaggtttcaag
DNA	M439-OXTR-Ex4-R04	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgacagtaacacactgagctgattacc

6.2.2 Gen für den Östrogenrezeptor α (ESR1)⁶⁴

Type	Sequence name	Purification	Synthesis scale	Shipping Condition	Sequence
DNA	M487-Esr1-Ex1-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTCCTAGTCAAATGGTGGTGC
DNA	M488-Esr1-Ex1-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaTGCTTGAAACAGTAGCACATTATATC
DNA	M489-Esr1-Ex2-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgAAGGAAATCTGTAGAAATCACCC
DNA	M490-Esr1-Ex2-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaAAAATCGTTCTCAAACACTGATG
DNA	M491-Esr1-Ex3-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgACTGCACTTGCTCCCGTC
DNA	M492-Esr1-Ex3-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCTCGGAGACACGCTGTTGAG
DNA	M493-Esr1-Ex3-F02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgGTACCTGGACAGCAGCAAG
DNA	M494-Esr1-Ex3-R02	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaAACTTGACTCTGAACGCAGC
DNA	M495-Esr1-Ex4-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgATCTGCTGCATCTCCAGAG
DNA	M496-Esr1-Ex4-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaTCTGTCTCTTCTCCATGTTTC
DNA	M497-Esr1-Ex5-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTCTGACTGGCTAAGTTTCTG
DNA	M498-Esr1-Ex5-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaATTCCAATGGGTAGAGCCAG
DNA	M499-Esr1-Ex6-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTCAAATAAAATGAAAGCTGGTTAGC
DNA	M500-Esr1-Ex6-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaTTTCTCCCATGACATCACAAAC
DNA	M501-Esr1-Ex7-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgCCTTGTCAGTTCAAATCCCTG
DNA	M502-Esr1-Ex7-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCCCAATGCACTCTTTTG
DNA	M503-Esr1-Ex8-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTGAATGTTATATTCATGAAGAC
DNA	M504-Esr1-Ex8-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaCCTTTGGAGTGGGTAGATCG
DNA	M505-Esr1-Ex9-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgTGGGTCTCTAGACCTCATCC
DNA	M506-Esr1-Ex9-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGCTGTACATAGGTTTGGGG
DNA	M507-Esr1-Ex10-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgAGGGATTCAGCACTCCTGG
DNA	M508-Esr1-Ex10-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGAATCCCTTTGGCTGTTCC
DNA	Esr1-E10-F01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	gtaaacgacggccagtgGGATTCAGCACTCCTGGG
DNA	Esr1-E10-R01	Desalted	0,02 µmol	diss. 100 µM	ggaacagctatgaccatgaGAATCCCTTTGGCTGTTCC

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Vergleich der anatomischen Verhältnisse im kleinen Becken im Normalfall und bei Patientinnen mit MRKH-Syndrom ⁶	2
Abbildung 2	Entwicklung der zunächst indifferenten Gonadenanlage beim männlichen und weiblichen Embryo ¹³	4
Abbildung 3	Spektrum der Müllergang-Fehlbildungen entsprechend der AFS-Klassifikation ¹⁹	7
Abbildung 4	ESHRE/ESGE-Klassifikation weiblicher genitaler Fehlbildungen am Beispiel uteriner Malformationen ²⁰	8
Abbildung 5	Spleißvorgang in Einzelschritten	17
Abbildung 6	Abfolge der Einzelschritte des methodischen Vorgehens im Rahmen der vorliegenden Arbeit	23
Abbildung 7	Darstellung des Poly-T-Stretches in Exon 06 des Gens für den Östrogenrezeptor α (ESR1)	38
Abbildung 8	Darstellung der bei Probe a48 in Exon 05 heterozygot aufgetretenen Basensubstitution c.720C>T.	63
Abbildung 9	Darstellung der bei Probe a07 in Exon 06 heterozygot gefundenen Basensubstitution c.805C>T.	64
Abbildung 10	Von der Analysesoftware PolyPhen2 kalkulierten Pathogenitätsscore des bei Probe a07 in Exon 06 heterozygot aufgetretenen SNP c.805C>T. ⁷⁶	65
Abbildung 11	Darstellung des bei Probe a23 in Exon 10 und somit im Bereich der 3'-UTR heterozygot detektierten SNP c.*96C>T.	66
Abbildung 12	Beispiel einer heterozygoten Basenveränderung in Exon 10 Position 229 des Gens ESR1	69
Abbildung 13	Beispiel eines Artefakts in Exon 03_1 Position 92 des Gens OXTR.....	70
Abbildung 14	Struktur von ER α inklusive potenziell aktivierender Phosphorylierungsstellen.....	75
Abbildung 15	Darstellung der alternativen 5'-Spleißstelle durch die Basensubstitution c.720C>T in ESR1.	77

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1</i>	<i>vorgefertigte Reaktionslösungen</i>	25
<i>Tabelle 2</i>	<i>Enzyme</i>	25
<i>Tabelle 3</i>	<i>Geräte</i>	26
<i>Tabelle 4</i>	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	27
<i>Tabelle 5</i>	<i>Software und Internetressourcen</i>	28
<i>Tabelle 6</i>	<i>Exonkoordinaten von OXTR (NM_000916.3⁶³)entsprechend des Transkripts ENST00000316793⁷⁰</i>	39
<i>Tabelle 7</i>	<i>Bei Sequenzanalyse von OXTR (NM_000916.3⁶³) detektierte Basenveränderungen</i>	41
<i>Tabelle 8</i>	<i>Exonkoordinaten von ESR1 (NM_0011227421⁶³)entsprechend des Transkripts ENST00000440973⁷⁰</i>	53
<i>Tabelle 9</i>	<i>Bei Sequenzanalyse von ESR1 (NM_0011227421⁶³) detektierte Basenveränderungen</i>	54

9 Literaturverzeichnis

1. Practice Committee of American Society for Reproductive M. Current evaluation of amenorrhea. *Fertility and sterility*. 2008;90(5 Suppl):S219-225.
2. Bacopoulou F, Creatsas G, Chrousos GP, Papanikolaou N, Deligeoroglou E. Primary amenorrhea in adolescent girls: normal coitus or not? Always take a look in the physician's office. *BMC women's health*. 2014;14(1):23.
3. Morcel K, Guerrier D, Watrin T, Pellerin I, Leveque J. [The Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: clinical description and genetics]. *Journal de gynecologie, obstetrique et biologie de la reproduction*. 2008;37(6):539-546.
4. Morcel K, Camborieux L, Programme de Recherches sur les Aplasies M, Guerrier D. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 2007;2:13.
5. Sultan C, Biason-Lauber A, Philibert P. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: recent clinical and genetic findings. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*. 2009;25(1):8-11.
6. Miklos JR MR. <http://miklosandmoore.com/mrkh-surgeons/mrkh-information/>. Accessed 29.08.2015, 2015.
7. Pizzo A, Lagana AS, Sturlese E, et al. Mayer-rokitansky-kuster-hauser syndrome: embryology, genetics and clinical and surgical treatment. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2013;2013:628717.
8. Heller-Boersma JG, Schmidt UH, Edmonds DK. Psychological distress in women with uterovaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser Syndrome, MRKH). *Psychosomatics*. 2009;50(3):277-281.
9. Holt R, Slade P. Living with an incomplete vagina and womb: an interpretative phenomenological analysis of the experience of vaginal agenesis. *Psychology, health & medicine*. 2003;8(1):19-33.
10. Laggari V, Diareme S, Christogiorgos S, et al. Anxiety and depression in adolescents with polycystic ovary syndrome and Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Journal of psychosomatic obstetrics and gynaecology*. 2009;30(2):83-88.
11. Masse J, Watrin T, Laurent A, Deschamps S, Guerrier D, Pellerin I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *The International journal of developmental biology*. 2009;53(2-3):411-424.
12. Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A, McMahon AP. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Developmental cell*. 2005;9(2):283-292.
13. *Anatomy & Physiology, Connexions Web site, Rice University* <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>. Version 1.4 Jun 26, 2013. Accessed 28.08.2015.
14. Biason-Lauber A. Control of sex development. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*. 2010;24(2):163-186.

15. Kurita T. Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation; research in biological diversity*. 2011;82(3):117-126.
16. Gell JS. Mullerian anomalies. *Seminars in reproductive medicine*. 2003;21(4):375-388.
17. Ludwig KS. The Mayer-Rokitansky-Kuster syndrome. An analysis of its morphology and embryology. Part II: Embryology. *Archives of gynecology and obstetrics*. 1998;262(1-2):27-42.
18. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine reviews*. 1999;20(3):358-417.
19. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG). 2010.
20. Grimbizis GF, Gordts S, Di Spiezio Sardo A, et al. The ESHRE/ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Human reproduction*. 2013;28(8):2032-2044.
21. Goldwyn RM. History of attempts to form a vagina. *Plastic and reconstructive surgery*. 1977;59(3):319-329.
22. Oppelt P, Renner SP, Kellermann A, et al. Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. *Human reproduction*. 2006;21(3):792-797.
23. Mayer CAJ. Über Verdopplung des Uterus und ihre Arten nB, über Hasenscharte und Wolfsrachen. *J Chir Augenheilk* 13: 525-564.
24. *Jahrb RCÜdsVdUM, Öst Staat* 26: 39-46.
25. Z KH. Uterus bipartitus solidus rudimentarius cum vagina solida. *Geburtshilfe Gynäkol* 67: 692-718, 1910.
26. Hauser GA aSW. [Mayer-Rokitansky-Kuester syndrome. Rudimentary solid bipartite uterus with solid vagina.]. *Schweiz Med Wochenschr* 91: 381-384, 1961.
27. Simpson JL. Genetics of the female reproductive ducts. *American journal of medical genetics*. 1999;89(4):224-239.
28. Martinez-Frias ML, Bermejo E, Rodriguez-Pinilla E, Prieto L, Frias JL. Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers. *American journal of medical genetics*. 1998;78(2):140-145.
29. Hoffmann W, Grospietsch G, Kuhn W. Thalidomide and female genital malformations. *Lancet*. 1976;2(7989):794.
30. Steinkampf MP, Dharia SP, Dickerson RD. Monozygotic twins discordant for vaginal agenesis and bilateral tibial longitudinal deficiency. *Fertility and sterility*. 2003;80(3):643-645.
31. Schinzel A. Phocomelia and additional anomalies in two sisters. *Human genetics*. 1990;84(6):539-541.
32. Cramer DW, Goldstein DP, Fraer C, Reichardt JK. Vaginal agenesis (Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome) associated with the N314D mutation of galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT). *Molecular human reproduction*. 1996;2(3):145-148.
33. Timmreck LS, Gray MR, Handelin B, et al. Analysis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in patients with congenital absence of the uterus and vagina. *American journal of medical genetics. Part A*. 2003;120A(1):72-76.

34. Klipstein S, Bhagavath B, Topipat C, Sasur L, Reindollar RH, Gray MR. The N314D polymorphism of the GALT gene is not associated with congenital absence of the uterus and vagina. *Molecular human reproduction*. 2003;9(3):171-174.
35. Oppelt P, Strissel PL, Kellermann A, et al. DNA sequence variations of the entire anti-Mullerian hormone (AMH) gene promoter and AMH protein expression in patients with the Mayer-Rokitanski-Kuster-Hauser syndrome. *Human reproduction*. 2005;20(1):149-157.
36. Lindenman E, Shepard MK, Pescovitz OH. Mullerian agenesis: an update. *Obstetrics and gynecology*. 1997;90(2):307-312.
37. Resendes BL, Sohn SH, Stelling JR, et al. Role for anti-Mullerian hormone in congenital absence of the uterus and vagina. *American journal of medical genetics*. 2001;98(2):129-136.
38. van Lingen BL, Reindollar RH, Davis AJ, Gray MR. Further evidence that the WT1 gene does not have a role in the development of the derivatives of the mullerian duct. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1998;179(3 Pt 1):597-603.
39. Hombria JC, Lovegrove B. Beyond homeosis--HOX function in morphogenesis and organogenesis. *Differentiation; research in biological diversity*. 2003;71(8):461-476.
40. Burel A, Mouchel T, Odent S, et al. Role of HOXA7 to HOXA13 and PBX1 genes in various forms of MRKH syndrome (congenital absence of uterus and vagina). *Journal of negative results in biomedicine*. 2006;5:4.
41. Ekici AB, Strissel PL, Oppelt PG, et al. HOXA10 and HOXA13 sequence variations in human female genital malformations including congenital absence of the uterus and vagina. *Gene*. 2013;518(2):267-272.
42. Rall K, Barresi G, Walter M, et al. A combination of transcriptome and methylation analyses reveals embryologically-relevant candidate genes in MRKH patients. *Orphanet journal of rare diseases*. 2011;6:32.
43. Ledig S, Schippert C, Strick R, Beckmann MW, Oppelt PG, Wieacker P. Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. *Fertility and sterility*. 2011;95(5):1589-1594.
44. Ledig S, Brucker S, Barresi G, Schomburg J, Rall K, Wieacker P. Frame shift mutation of LHX1 is associated with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome. *Human reproduction*. 2012;27(9):2872-2875.
45. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *The New England journal of medicine*. 2004;351(8):792-798.
46. Biason-Lauber A, De Filippo G, Konrad D, Scarano G, Nazzaro A, Schoenle EJ. WNT4 deficiency--a clinical phenotype distinct from the classic Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a case report. *Human reproduction*. 2007;22(1):224-229.
47. Rall K, Barresi G, Wallwiener D, Brucker SY, Staebler A. Uterine rudiments in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome consist of typical uterine tissue types with predominantly basalis-like endometrium. *Fertility and sterility*. 2013;99(5):1392-1399.

48. Ren L, Liu YQ, Zhou WH, Zhang YZ. Trophoblast-derived chemokine CXCL12 promotes CXCR4 expression and invasion of human first-trimester decidual stromal cells. *Human reproduction*. 2012;27(2):366-374.
49. Rall K, Eisenbeis S, Barresi G, et al. Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome discordance in monozygotic twins: matrix metalloproteinase 14, low-density lipoprotein receptor-related protein 10, extracellular matrix, and neoangiogenesis genes identified as candidate genes in a tissue-specific mosaicism. *Fertility and sterility*. 2014.
50. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
51. Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *The Journal of pathology*. 2010;220(2):152-163.
52. Pandya-Jones A. Pre-mRNA splicing during transcription in the mammalian system. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*. 2011;2(5):700-717.
53. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009;136(4):701-718.
54. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*. 2004;5(7):522-531.
55. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-297.
56. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-854.
57. miRBase <http://www.mirbase.org/>. Release 21 June 2014. Accessed 28.08.2015.
58. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D140-144.
59. Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23(20):4051-4060.
60. Jovanovic M, Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene*. 2006;25(46):6176-6187.
61. Rückner D. Expressionsanalysen der miRNA 98, 145 und 203: Mögliche epigenetische Ursachen des MRKH-Syndroms 2014.
62. International HapMap C. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-796.
63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Release 211.0; december 2015. Accessed 24.01.2016.
64. <https://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerR.pl?dir=/>. Accessed 27.02.2013.
65. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature biotechnology*. 2000;18(2):233-234.
66. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.

67. Brock TD, Freeze H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of bacteriology*. 1969;98(1):289-297.
68. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*. 1991;19(14):4008.
69. Angaben des Herstellers New England BioLabs FaM.
70. <http://www.srd-biotec.de/download/trouble-shooting.pdf>. Accessed 24.01.2016.
71. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/. Release 83; december 2015. Accessed 24.01.2016.
72. <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>. GRCh38 Genome Reference Consortium Human Reference 38, Dec.2013. Accessed 16.10.2015.
73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>. build 144; Jun 08, 2015. Accessed 16.07.2015.
74. <http://www.1000genomes.org>. version 3.4. Released January 2015. Accessed 13.02.2015.
75. <http://www.ebi.ac.uk/eva/>. release 125 sept 2015. Accessed 21.10.2015.
76. Alamut® Visual.
77. PolyPhen 2 <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/start>. version 2.1.0; 2012. Accessed 28.03.2015.
78. Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Molecular endocrinology*. 2007;21(5):1132-1147.
79. <http://www.ensembl.org/index.html>. release 83 - December 2015. Accessed 14.01.2016.
80. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1977;74(12):5463-5467.
81. Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiological reviews*. 2001;81(2):629-683.
82. Arpin-Bott MP, Waltisperger E, Freund-Mercier MJ, Stoeckel ME. Two oxytocin-binding site subtypes in rat kidney: pharmacological characterization, ontogeny and localization by in vitro and in vivo autoradiography. *The Journal of endocrinology*. 1997;153(1):49-59.
83. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, McCann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(21):11704-11709.
84. Ylisaukko-oja T. Search for Susceptibility Genes in Autism Spectrum Disorders: Department of Molecular Medicine, National Public Health Institute, Helsinki, Finland and Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Finland; 2005.
85. Murata T, Murata E, Liu CX, Narita K, Honda K, Higuchi T. Oxytocin receptor gene expression in rat uterus: regulation by ovarian steroids. *The Journal of endocrinology*. 2000;166(1):45-52.

86. Kimura T, Ogita K, Kumasawa K, Tomimatsu T, Tsutsui T. Molecular analysis of parturition via oxytocin receptor expression. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*. 2013;52(2):165-170.
87. Bale TL, Dorsa DM. Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology*. 1997;138(3):1151-1158.
88. Fuchs AR, Fuchs F, Husslein P, Soloff MS, Fernstrom MJ. Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science*. 1982;215(4538):1396-1398.
89. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome research*. 1998;8(12):1229-1231.
90. Lopes MC, Joyce C, Ritchie GR, et al. A combined functional annotation score for non-synonymous variants. *Human heredity*. 2012;73(1):47-51.
91. Tsai MJ, O'Malley BW. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual review of biochemistry*. 1994;63:451-486.
92. Ward RD, Weigel NL. Steroid receptor phosphorylation: Assigning function to site-specific phosphorylation. *BioFactors*. 2009;35(6):528-536.
93. Zwart W, de Leeuw R, Rondaij M, Neefjes J, Mancini MA, Michalides R. The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 8):1253-1261.
94. Human Splicing Finder www.umd.be/HSF/. 2.4.1 version released on October, 13th 2010. Accessed 28.02.2015.
95. Kenealy MR, Flouriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H, Gannon F. The 3'-untranslated region of the human estrogen receptor alpha gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology*. 2000;141(8):2805-2813.
96. Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*. 2005;65(16):7065-7070.
97. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ss.cgi?ss=ss48294137. build 144; Jun 08, 2015. Accessed 19.07.2015.
98. Jockenhövel F, Lehnert, H. Östrogene für den Mann – sinnvoll oder gefährlicher Unfug? *Dtsch Arztebl* 2004; 101: A 578–582 [Heft 9].
99. Wood EG, Batzer FR, Corson SL. Ovarian response to gonadotrophins, optimal method for oocyte retrieval and pregnancy outcome in patients with vaginal agenesis. *Human reproduction*. 1999;14(5):1178-1181.
100. Esfandiari N, Claessens EA, O'Brien A, Gotlieb L, Casper RF. Gestational carrier is an optimal method for pregnancy in patients with vaginal agenesis (Rokitansky syndrome). *International journal of fertility and women's medicine*. 2004;49(2):79-82.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsfrauenklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Sara Brucker durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Katharina Rall und Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin.

Alle Blutproben von Patientinnen mit MRKH-Syndrom entstammen der Blut- und Gewebebank der Universitätsfrauenklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Die Isolierung der DNA aus EDTA-Blut, die PCR und die Sequenzierreaktionen samt Aufreinigungsschritten wurden von mir selbstständig durchgeführt. Herr Dr. rer. nat. Michael Walter hat beim Design der Primer beraten; Herr Sven Poths, Frau Dr. rer. nat. Karin Schäferhoff und Frau Vanessa Vosseler standen bei labortechnischen Fragen mit ihrer Expertise zur Seite.

Die Datenauswertung erfolgte wiederum durch mich. Frau Dr. rer. nat. Ulrike Faust und Herr Dr. rer. nat. Stephan Waldmüller übernahmen hierbei eine beratende Funktion.

Die Korrektur des Manuskripts erfolgte durch Frau Dr. med. Katharina Rall, Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin und Frau Dr. rer. nat. Barbara van Eijck.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

11 Danksagung

Dank gebührt zuallererst meinen Eltern und meinen beiden Schwestern, die mich während meines gesamten Medizinstudiums unterstützt und ermutigt haben. Darum ist ihnen auch diese Arbeit gewidmet.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Sara Brucker bedanken, die die Betreuung meiner Doktorarbeit übernommen hat, für Fragen stets ansprechbar war und mein wissenschaftliches Arbeiten mit Anregungen und Interesse begleitet hat.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Katharina Rall und Herrn Dr. rer. nat. Michael Bonin. Sie haben mir als primäre Ansprechpartner sowohl bei den Laborarbeiten als auch später bei der Verfassung der Dissertationsschrift mit Rat und Tat zur Seite gestanden und für meine Fragen stets ein offenes Ohr gehabt.

Herzlichen Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Ulrike Faust und Herrn Dr. rer. nat. Stephan Waldmüller für die kompetente und freundliche Einführung in die Sequenzanalyse und Beratung bei kniffligen Basenveränderungen sowie an Frau Dr. rer. nat. Barbara van Eijck für die Durchsicht meines Manuskripts.

Für die Integration meiner Arbeit in den Rahmen der Grundlagenforschung zum Thema MRKH-Syndrom an der Universitätsfrauenklinik Tübingen möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Simone Eisenbeis bedanken.

Schließlich, aber nicht zuletzt, danke ich ganz besonders herzlich allen Kolleginnen und Kollegen, die mich bei den Laborarbeiten mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung hilfsbereit unterstützt haben. Namentlich Herrn Dr. rer. nat. Michael Walter für die Beratung beim Design der Primer sowie Herrn Sven Poths, Frau Dr. rer. nat. Karin Schäferhoff und Frau Vanessa Vosseler für geduldige Erklärungen, freundliche Anleitung und die tolle Arbeitsatmosphäre.

11 Danksagung

Auch den Kolleginnen von der Diagnostik, mit denen ich im Großraumlabor teilweise zusammenarbeiten durfte, möchte ich für ihr wohlwollendes Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft danken.