Universität Ulm
Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. Walther Vogel

Molekulargenetische Untersuchungen zur Geschlechtsdeterminierung bei Patienten mit Swyer-Syndrom und im Tiermodell *Ellobius lutescens*

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Annette Baumstark
aus Heidenheim / Brenz

Ulm, 2000

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Peter Gierschik
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Walther Vogel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ingrid Reisert
Tag der Promotion: 22.12.2000

Verwendete Abkürzungen

AHC	Adrenal hypoplasia congenita
AMH	Anti-Müller-Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
Bq	Beguerel
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	desoxy-Nucleosidtriphosphat
d.p.c.	days post coitum
d.p.o.	days post ovulation
ED	embryonic day
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMD™	Enzymatic mutation detection
FISH	Fluoreszenz-*in*-*situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDB	Genome Database
HHG	Hypogonadotropic hypogonadism
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranosid
kbp	Kilobasenpaare
Mbp	Megabasenpaare
mRNA	messenger RNA
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pfu	Plaque forming unit
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	rotations per minute

RT	Raumtemperatur
SOB	Sophisticated Broth
SDS	Sodium-dodecyl-sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSC	Sodium-saline-citrate
SSPE	Sodium-sodiumphosphate-EDTA
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
U	Unit
UV	Ultraviolett
w / v	weight per volume
Xp	kurzer Arm des X-Chromosoms
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3 indoxyl-β-D-galaktosid
9p	kurzer Arm von Chromosom 9

1 EINLEITUNG

Die Existenz verschiedener Geschlechter bei den meisten höheren Organismen erfordert komplexe Mechanismen der Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung. Die Geschlechtsdeterminierung geht hierbei der Geschlechtsdifferenzierung voraus und legt fest, welches phänotypische Geschlecht ausgebildet wird. Bei den Vertebraten existieren hierfür zwei grundlegende Mechanismen. Die Geschlechtsdeterminierung der Säuger, Vögel und vieler Reptilien wird ausschließlich genetisch gesteuert, während die Geschlechtsdeterminierung mancher Fische, Amphibien und anderer Reptilien zusätzlich oder ausschließlich von Umweltfaktoren beeinflußt wird.

Bei den Säugetieren besitzen männliche Organismen die Gonosomenkonstitution XY, weibliche XX. Das Geschlecht wird daher bereits bei der Befruchtung durch das im väterlichen Spermium enthaltene Gonosom X oder Y festgelegt. Ist in der Zygote ein Y-Chromosom enthalten, entwickelt sich ein männlicher Organismus, unabhängig davon wieviele X-Chromosomen vorhanden sind (Ford et al. 1959). In Abwesenheit eines Y-Chromosoms entsteht ein weiblicher Organismus. Das für diesen dominanten Effekt verantwortliche, Y-chromosomale Gen *SRY* ist bereits seit 10 Jahren bekannt (Sinclair et al. 1990). Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß noch zahlreiche andere Gene an der Geschlechtsdeterminierung beteiligt sind. Einige davon sind bereits identifiziert und sollen im Folgenden noch vorgestellt werden. Auch über Mechanismen und Interaktionen der beteiligten Gene, die der Geschlechtsdeterminierung zugrunde liegen, kann bisher nur spekuliert werden. Zur Identifizierung geschlechtsdeterminierender Gene, bzw. zur Aufklärung geschlechtsdeterminierender Mechanismen eignen sich Untersuchungen an Patienten oder Tiermodellen, die Diskrepanzen zwischen genotypischem und phänotypischem Geschlecht aufweisen.

1.1 Differenzierung von Gonaden und Gonodukten während der Embryonalentwicklung des Menschen

Die Gonadenanlagen der Vertebraten werden während der Embryonalentwicklung zunächst bipotent angelegt, d. h. es kann eine spätere Differenzierung zu Ovarien oder zu Testes stattfinden. Die Gonadenanlagen entstehen am ventromedialen

Rand der Urniere als sogenannte Keimleisten. Die Primordialkeimzellen wandern in diesem Stadium bereits aus der Dottersackwand in die Gonadenanlage ein. An der Urniere werden außerdem in beiden Geschlechtern zwei verschiedene Gangsysteme angelegt: die Wolffschen und Müllerschen Gänge.

Die Induktion der Hodenentwicklung erfolgt etwa in der sechsten Woche der Embryonalentwicklung und bewirkt zunächst die Ausbildung von Keimsträngen. Diese entstehen durch die Zusammenlagerung von Keimzellen und somatischen Zellen und werden in der weiteren Entwicklung durch Kanalisierung zu den Hodenkanälchen. Aus den Primordialkeimzellen differenzieren sich die Spermatogonien, während aus den somatischen Zellen der Keimstränge die Sertolizellen entstehen. Die Spermatogonien vermehren sich zunächst weiter, bevor sie in der Pubertät als Spermatozyten in die Spermiogenese eintreten. Somatische Zellen, die nicht an der Bildung von Hodenkanälchen beteiligt sind, entwickeln sich zu Leydigschen Zwischenzellen. In den Sertolizellen wird das Anti-Müller-Hormon (AMH) (Cate et al. 1986) gebildet, das die Regression der Müllerschen Gänge bewirkt. Das in den Leydigschen Zwischenzellen produzierte Testosteron induziert hingegen die verschiedenen Differenzierungsprozesse der Wolffschen Gänge zu Nebenhodengang, Samenleiter und Samenblasendrüse. Die Ausbildung der männlichen äußeren Geschlechtsorgane geschieht ebenfalls unter dem Einfluß von Testosteron.

Wird keine Hodenentwicklung induziert, so entwickelt sich die Gonadenanlage zum Eierstock. Dieser Prozeß ist im Gegensatz zur Hodenentwicklung davon abhängig, ob in der Gonadenanlage Primordialkeimzellen vorhanden sind. In Abwesenheit von intakten Keimzellen wird kein Ovar differenziert. Die Entwicklung der Eierstöcke verläuft langsamer als die der Hoden. Es erfolgt eine sehr starke Vermehrung der im Rindenbereich gelegenen Primordialkeimzellen, die nach Eintritt in die Meiose als Oozyten bezeichnet werden. Primäre Oozyten werden während der Fetalzeit von Follikelzellen umgeben, wodurch Primordialfollikel entstehen. Aufgrund der niedrigen Testosteronkonzentration im weiblichen Organismus degenerieren die Wolffschen Gänge. Die Müllerschen Gänge differenzieren sich in Abwesenheit von AMH zu den Eileitern und zum Uterovaginalkanal. Ohne hormonelle Beeinflussung entwickeln sich außerdem weibliche äußere Geschlechtsorgane.

1.2 Gene, die an der Geschlechtsdeterminierung der Säuger beteiligt sind

1.2.1 SRY

Bei den Säugetieren wird die Ausbildung eines männlichen Phänotyps in der Regel durch die Präsenz eines Y-Chromosoms bestimmt. Das hierfür verantwortliche Y-chromosomale Gen *SRY* (sex determining region on the Y chromosome) induziert die Testisdifferenzierung und wurde bisher, mit wenigen Ausnahmen, bei allen untersuchten Säuger-Spezies gefunden (Sinclair et al. 1990, Gubbay et al. 1990, Berta et al. 1990, Jäger et al. 1990). Das humane *SRY*-Gen ist auf Yp11.3 lokalisiert. Es besteht aus nur einem Exon (Behlke et al. 1993) und codiert für ein 229 Aminosäuren umfassendes Protein. Dieses enthält ein DNA-bindendes Motiv, das wegen seines Vorkommens bei Nicht-Histon-Proteinen der 'High-Mobility-Group' als HMG-Box bezeichnet wird (Jantzen et al. 1990). SRY ist in der Lage, DNA sequenzspezifisch zu binden (Harley et al. 1992; Harley et al. 1994) und in einem definierten Winkel von 60 - 85° zu biegen (Ferrari et al. 1992; Giese et al. 1994). Daher wird spekuliert, daß es sich bei SRY um einen Transkriptionsfaktor handelt, der seine Funktion dadurch ausübt, daß er die Chromatinstruktur in den regulatorischen Abschnitten von Zielgenen so verändert, daß die Anlagerung regulatorischer Elemente ermöglicht wird (Grosschedl et al. 1994, Wolffe 1994).

Die Funktion der *SRY*-Sequenzen außerhalb der HMG-Box ist noch weitgehend unklar. Diese Abschnitte zeigen einerseits eine sehr geringe Konservierung zwischen den verschiedenen Säuger-Spezies (Koopman 1999), andererseits sind sehr wenige Mutationen bekannt, die in diesen Bereichen lokalisiert sind und zur XY-Geschlechtsumkehr, also zum Funktionsverlust des Proteins führen (McElreavey et al. 1992, McElreavey et al. 1996, Tajima et al. 1994, Veitia et al. 1997; Poulat et al. 1998).

Die Expression des *SRY*-Gens erfolgt in den Sertolizellen der embryonalen Gonadenanlage (Koopman et al. 1990, Hanley et al. 2000). Bei verschiedenen Spezies wurde außerdem Expression in weiteren foetalen und adulten männlichen Geweben gefunden (Clepet et al. 1993, Zwingman et al. 1993, Fiddler et al. 1995, Harry et al. 1995, Lahr et al. 1995, Gutierrez-Adan et al. 1997, Mayer et al. 1998), wobei deren Bedeutung noch unklar ist. Beim Menschen beginnt die *SRY*-Expression zwischen 41 und 44 d.p.o. (days post ovulation) und ist auch in der 18.

Schwangerschaftswoche (SSW) noch nachzuweisen (Hanley et al. 2000), während die Expression bei der Maus auf einen kurzen Zeitraum zwischen Tag 10,5 und 12,5 der Embryonalentwicklung beschränkt ist (Koopman et al. 1990, Gubbay et al. 1990).

Die Höhe der *SRY*-Expression scheint für die Geschlechtsdeterminierung eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei der Maus sind Mutationen bekannt, die zu einer Verringerung der *Sry*-Expression führen und damit eine XY-Geschlechtsumkehr hervorrufen können (Capel et al. 1993, Eicher et al. 1982, Nagamine et al., Daten nicht publiziert, zitiert in Koopman 1999). Ein Beispiel hierfür ist das *Sry* des *Mus musculus* Stammes *Poschiavinus*, das bei Kreuzung auf einen *M. m. domesticus* Hintergrund zur XY-Geschlechtsumkehr führt (Eicher et al. 1982). Es wird vermutet, daß in der Genitalleiste während der Entwicklung zu einem bestimmten Zeitpunkt eine kritische *Sry*-Dosis überschritten werden muß, um eine Testisdifferenzierung zu initiieren.

Die Tatsache, daß *SRY* bei fast allen untersuchten Säugetieren vorhanden ist und die einheitliche Lokalisation auf dem Y-Chromosom legen die Vermutung nahe, daß auch die Funktion von *SRY* als testisdeterminierender Faktor konserviert ist. Andererseits scheint die Bedeutung von *SRY* zwischen unterschiedlichen Spezies zu variieren. Dafür spricht, daß der Konservierungsgrad der *SRY*-Sequenz relativ gering ist (Koopman et al. 1999). Auch das Expressionsmuster und die biochemischen Eigenschaften des Proteins zeigen artspezifische Unterschiede (Koopman et al. 1990, Ferrari et al. 1992, Harry et al. 1995).

Schließlich wird die Bedeutung von *SRY* als konservierter testisdeterminierender Faktor auch durch das Vorkommen von Säuger-Spezies in Frage gestellt, die weder ein Y-Chromosom, noch ein *SRY*-Gen aufweisen, z. B. *Ellobius lutescens*, *Ellobius tancrei*, *Tokudaia osimensis* (Matthey 1953, Just et al. 1995; Honda et al. 1977, Soullier et al. 1998). Bei diesen Arten muß die testisdeterminierende Funktion von *SRY* durch ein anderes, vermutlich normalerweise *SRY*-nachgeschaltetes Gen übernommen worden sein. Dies dürfte ein Hinweis darauf sein, daß *SRY* keine Funktion bei der männlichen Differenzierung hat, sondern lediglich als Schalter fungiert, der die Testisdeterminierung initiiert (Pask und Graves 1999).

1.2.2 SOX9

SOX9 ist neben *SRY* ein weiteres HMG-Box-Protein, das an der Geschlechtsdeterminierung beteiligt ist (Foster et al. 1994, Wagner et al. 1994). *SOX*-Gene (*SRY* related HMG-Box) sind dadurch definiert, daß sie auf Proteinebene innerhalb der HMG-Box-Region mehr als 50% Homologie zu *SRY* besitzen (Denny et al. 1992). Sie haben unter anderem wichtige Funktionen bei der Differenzierung verschiedener Gewebe während der Embryonalentwicklung.

SOX9 ist außer an der Geschlechtsdeterminierung auch an der Knorpelbildung beteiligt. Haploinsuffizienz des *SOX9*-Gens führt zur Kampomelen Dysplasie, einer Krankheit, die neben Skelettfehlbildungen, bei ca. 70% der Patienten mit männlichem Karyotyp zur Geschlechtsumkehr führt (Foster et al. 1994, Wagner et al. 1994).

SOX9 liegt beim Menschen auf Chromosom 17q24.3 - q25.1 (Foster et al. 1994, Wagner et al. 1994). Die Struktur des *SOX*-Gens ist bei allen bisher untersuchten Vertebraten hoch konserviert (Foster et al. 1994, Wright et al. 1995, Morais da Silva et al. 1996, Takamatsu et al. 1997, Western et al. 1999). Neben der HMG-Box, die im N-terminalen Abschnitt lokalisiert und für die DNA-bindende Funktion verantwortlich ist, besitzt das Protein am C-terminalen Ende eine Transaktivierungsdomäne. Der hohe Konservierungsgrad schließt auch den Aufbau des Gens aus drei Exons, sowie die Position der beiden Introns ein. Translokationsbruchpunkte bei Patienten mit Kampomeler Dysplasie deuten darauf hin, daß regulatorische Elemente des *SOX9*-Gens im Abstand von möglicherweise über 1 Mbp 5' des Gens existieren (Pfeifer et al. 1999). Evidenz dafür liefern auch Befunde bei transgenen Mäusen. Durch die Insertion eines Tyrosinase-Transgens ca. 1,3 Mbp proximal der codierenden Sequenz erfolgt eine Überexpression von *Sox9*, was auf die Zerstörung einer Repressor-Bindungsstelle zurückgeführt wird (Overbeek et al. 1999; C. Bishop, 2nd International Symposium on The Biology of Vertebrate Sex Determination, 2000).

Die Expression von *SOX9* in der Gonadenanlage beginnt bei humanen männlichen Embryonen zwischen 41 und 44 d.p.o., also etwa gleichzeitig mit der Expression von *SRY* (Hanley et al. 2000). Sie erreicht zwischen 44 und 52 d.p.o., kurz nach der maximalen *SRY*-Expression das Maximum. Bei weiblichen Embryonen ist eine etwas später einsetzende und nur schwache Expression zu beobachten.

Bei der Maus wurde bereits an Tag 10,5 der Embryonalentwicklung Expression von *Sox9* in beiden Geschlechtern gefunden (Morais da Silva et al. 1996). In der männlichen Gonadenanlage erfolgt ein Anstieg der Expression an Tag 11,5, während bei weiblichen Embryonen ab diesem Zeitpunkt keine Transkription mehr nachweisbar ist (Kent et al. 1996, Morais da Silva et al. 1996).
Die *Sox9*-Expression in der Gonadenanlage beider Geschlechter findet bei der Maus statt, bevor die ersten Differenzierungsschritte zu Testes oder Ovarien erkennbar sind. Das legt die Vermutung nahe, daß *Sox9* eine Rolle bei der Geschlechtsdeterminierung spielen könnte. Im Gegensatz dazu ist beim Alligator die Expression von *Sox9* erst detektierbar, nachdem schon testikuläre Strukturen vorhanden sind (Western et al. 1999). Beim Huhn geht die Expression von *AMH* der *Sox9*-Expression voraus (Oreal et al. 1998). Dies bedeutet, daß zu diesem Zeitpunkt ebenfalls schon Sertolizellen differenziert sein müssen, und daß *Sox9* bei diesen Tieren keine geschlechtsdeterminierende Funktion mehr ausüben kann, sondern vermutlich eine Rolle bei der folgenden Testisdifferenzierung spielt.
Auch bei *SOX9* ist die Funktion stark von der Dosis abhängig. Wie bereits erwähnt führt eine Haploinsuffizienz in den meisten Fällen zur XY-Geschlechtsumkehr (Houston et al. 1983). Eine Erhöhung der *SOX9*-Dosis hingegen kann zur XX-Geschlechtsumkehr führen. Eine solche Dosis-Erhöhung kann entweder auf Expressionsebene auftreten, wie beispielsweise bei den oben beschriebenen transgenen *Odsex*-Mäusen, oder durch eine zusätzliche Kopie des Gens auf DNA-Ebene. Dies wurde bei einem phänotypisch männlichen Patienten, mit dem Mosaik-Karyotyp 46,XX,dup(17)(q23.1q24.3)/46,XX gezeigt, bei dem in der einen Zellinie drei *SOX9*-Kopien vorhanden sind (Huang et al. 1999). *SOX9* stellt zur Zeit das einzige Kandidatengen für eine XX-Geschlechtsumkehr dar.

1.2.3 DMRT1

Das *DMRT1*-Gen (*doublesex*- and *mab-3*-related transcription factor 1) wurde beim Menschen aufgrund seiner Homologie zu den geschlechtsspezifischen Regulatorgenen *mab-3* (*male abnormal 3*) von *Caenorhabditis elegans* und *doublesex* (*dsx*) von *Drosophila melanogaster* entdeckt (Raymond et al. 1998). Diese beiden Gene kodieren für Proteine, die ein als DM-Domäne (für Doublesex und MAB-3) bezeichnetes DNA-bindendes Motiv besitzen, das auch bei DMRT1

vorhanden ist. Die Ähnlichkeit von *mab-3* und *dsx* bezüglich Struktur und Funktion deutet auf einen möglichen gemeinsamen evolutionären Ursprung des zugrundeliegenden geschlechtsdeterminierenden Mechanismus hin, der möglicherweise auch noch bei Vertebraten eine Rolle spielt.

Das humane *DMRT1* liegt auf Chromosom 9p24.3 (Raymond et al. 1998). Es umfaßt 127,4 kbp (GenBank Acc. Nr. AL136365) und besteht aus 5 Exons. *DMRT1* kodiert für ein 373 Aminosäuren umfassendes Protein, wobei die DM-Domäne im N-terminalen Abschnitt lokalisiert ist. Die Homologie zu DSX beträgt auf Proteinebene 67% zu MAB-3 50%. Außerhalb der DM-Domäne beschränkt sich die Übereinstimmung dieser Proteine allerdings auf einen Serin-Prolin-reichen Abschnitt nahe dem C-Terminus, dessen Funktion noch unklar ist (Raymond et al. 1999a).

Das murine Dmrt1-Protein zeigt innerhalb der DM-Domäne 98% Homologie zum humanen Protein. Betrachtet man das gesamte Protein, so beträgt die Homologie 82% (Raymond et al. 1999b). Das murine *Dmrt1*-Gen ist ebenfalls aus 5 Exons aufgebaut, und auch die Exon-Intron Übergänge sind konserviert.

Beim Huhn ist *Dmrt1* auf dem Z-Chromosom lokalisiert (Nanda et al. 1999), das durch Syntänie zum Chromosom 9 des Menschen gekennzeichnet ist. *Dmrt1* ist das einzige potentiell an der Geschlechtsdeterminierung beteiligte Gen, das bisher auf dem Z-Chromosom der Vögel gefunden wurde. Es stellt somit das erste Kandidatengen für die postulierte dosisabhängige Geschlechtsdeterminierung der Vögel dar (Nanda et al. 1999).

Bei adulten Menschen und Mäusen wird *DMRT1* nur im Testis exprimiert (Raymond et al. 1998, Raymond et al. 1999b). Während der Embryonalentwicklung des Menschen ist die *DMRT1*-Expression schon im 6 Wochen alten männlichen Embryo detektierbar, bevor testikuläre Strukturen sichtbar werden. In weiblichen Embryonen wird *DMRT1* nicht exprimiert (Moniot et al. 2000).

Bei der Embryonalentwicklung der Maus konnte die *Dmrt1*-mRNA ab ED9,5 nachgewiesen werden. Die Expression erfolgt ausschließlich in der Gonadenanlage beider Geschlechter. Nach Beginn der Gonadendifferenzierung, ca. ab ED14,5 geht die Expression im Ovar deutlich zurück, während sie im Testis aufrechterhalten wird. Die *Dmrt1*-Expression ist hier sowohl in den Sertolizellen als auch in den Keimzellen nachweisbar (Raymond et al. 1999b).

Auch bei Huhn und Alligator ist *Dmrt1* während der Embryonalentwicklung in männlichen Gonaden stärker exprimiert als in weiblichen (Smith et al. 1999, Shan et al. 2000). Beim Huhn konnte gezeigt werden, daß die Expression von *Dmrt1* der Expression von *AMH*, dem frühesten Marker der Testisentwicklung, und somit der Gonadendifferenzierung sogar vorausgeht (Raymond et al. 1999b).
Beim Menschen verursachen Deletionen des telomernahen Bereichs des kurzen Arms von Chromosom 9 eine XY-Geschlechtsumkehr (Hoo et al. 1989). Man geht davon aus, daß Haploinsuffizienz von *DMRT1* hierfür verantwortlich sein könnte, allerdings steht der Beweis dafür noch aus, z. B. anhand von Knock-out-Mäusen oder Mutationen bei Patienten mit XY-Geschlechtsumkehr.

1.2.4 DAX1

Duplikationen des kurzen Arms des X-Chromosoms können beim Menschen eine XY-Geschlechtsumkehr verursachen. Das kritische Intervall hierfür ist die auf 160 kbp eingegrenzte DSS-Region (dosage sensitive sex reversal) in Xp21.3 (Bardoni et al. 1994). In dieser Region wurde *DAX1* (DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1) als Kandidatengen identifiziert (Zanaria et al. 1994).
Das humane *DAX1*-Gen besteht aus zwei Exons und wird in eine ca. 1,9 kbp umfassende mRNA transkribiert (Zanaria et al. 1994; Guo et al. 1996).
Das Protein besteht aus zwei Untereinheiten mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften. Der carboxyterminale Anteil zeigt Ähnlichkeit zur ligandenbindenden Domäne (LBD) der nucleären Hormonrezeptoren, ein möglicher Ligand konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden (Goodfellow und Camerino, 1999). Ein für nucleäre Hormonrezeptoren typisches DNA-bindendes Zinkfinger-Motiv ist nicht vorhanden, sondern eine N-terminal gelegene repetitive Struktur, die möglicherweise eine neuartige DNA-bindende Domäne darstellt (Zanaria et al. 1994).
Das *Dax1*-Gen der Maus zeigt denselben strukturellen Aufbau wie das humane *DAX1* (Swain et al. 1996). Es besteht ebenfalls aus zwei Exons, wobei die Position des Introns konserviert ist. Über die gesamte codierende Region gerechnet ist der Grad der Homologie zwischen humanem und murinem *DAX1* relativ gering. Auf DNA-Ebene sind 75,5% der Sequenz identisch (Swain et al. 1996).

DAX1 wird beim Erwachsenen in Gonaden, Nebennieren, Hypothalamus und Hypophyse exprimiert (Zanaria et al. 1994; Guo et a. 1995). Während der Embryonalentwicklung des Menschen beginnt die relativ schwache *DAX1*-Expression in der Gonadenanlage an 33 d.p.o. in beiden Geschlechtern, also ca. 10 Tage vor der Expression von *SRY* (Hanley et al. 2000). Auch in der weiteren Entwicklung können keine Unterschiede in der Expression zwischen männlichen und weiblichen Individuen festgestellt werden. Die Expression des murinen *Dax1* beginnt im somatischen Anteil der Genitalleisten beider Geschlechter an ED11,5, gleichzeitig mit der Expression von *Sry* (Swain et al. 1996). Nach dem Auftreten der ersten morphologischen Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Embryonen an ED12 werden geschlechtsspezifische Unterschiede in der *Dax1*-Expression beobachtet. In den männlichen Gonaden geht die Expression drastisch zurück und kann ab ED12,5 nicht mehr detektiert werden. In weiblichen Gonaden bleibt die Expression bestehen.

Die für *DAX1* beim Menschen gefundene dosisabhängige antagonistische Wirkung zu *SRY* konnte bei der Maus bestätigt werden (Swain et al. 1998). Allerdings reicht hier eine zweifache Dosis nicht aus, um eine Geschlechtsumkehr zu erzeugen sondern es sind mehrere *Dax1*-Kopien bei gleichzeitiger Verwendung eines ‘schwachen *Sry*-Allels’ notwendig.

Deletionen des *DAX1*-Gens und Mutationen in *DAX1* verursachen beim Mann eine angeborene Nebenniereninsuffizienz (AHC=adrenal hypoplasia congenita) meistens in Verbindung mit hypogonadotropem Hypogonadismus (HHG) (Muscatelli et al. 1994). Die Patienten sind zwar steril, aber die Testisdifferenzierung ist nicht gestört, was bedeutet, daß *DAX1* nicht für eine normale Testisentwicklung benötigt wird. Daher wurde spekuliert, daß *DAX1* die Funktion eines ‘Anti-Testis’-Gen ausüben könnte, das möglicherweise für die Ovarienentwicklung benötigt wird (Bardoni et al. 1994).

1.2.5 Bedeutung anderer Gene

Für eine Reihe weiterer Gene wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Geschlechtsdeterminierung vermutet. Diese Vermutungen basieren zum größten Teil auf Untersuchungen an Patienten mit Geschlechtsumkehr oder vergleichbaren Maus-Mutanten. In vielen Fällen ist es jedoch zunächst schwierig zu

entscheiden, ob tatsächlich ein Defekt bei der Geschlechtsdeterminierung vorliegt, oder ob es sich um Störungen bei der Differenzierung der indifferenten Gonadenanlagen oder Gonodukte handelt. Beide Wirkungsweisen führen in vielen Fällen zu identischen Phänotypen. Die Unterscheidung beider Mechanismen erfordert die genaue Analyse von Lokalisation und Zeitpunkt der Expression.

1.3 Mögliche Mechanismen der Geschlechtsdeterminierung und Interaktionen geschlechtsdeterminierender und -differenzierender Gene

Für das Zusammenspiel der an der Geschlechtsdeterminierung und Geschlechtsdifferenzierung beteiligten Gene wurde ursprünglich ein kaskadenartiges Prinzip postuliert, bei dem ein Gen das jeweils folgende Gen aktiviert oder reprimiert (McElreavey et al. 1993). Es existieren verschiedene Variationen eines recht einfachen Modells für die Interaktion von *SOX9*, *SRY* und *DAX1* bei den Säugetieren. Eine Möglichkeit ist die, daß *SOX9* durch die Differenzierung der Sertolizellen die Ausbildung eines männlichen Phänotyps bewirkt, wobei *SRY* die dafür erforderliche Heraufregulation der *SOX9*-Expression initiiert. Diese testisdeterminierende Funktion wird von *DAX1* gehemmt. Mit Hilfe dieses Modells lassen sich zwar die durch die beteiligten Gene verursachten Fälle von Geschlechtsumkehr erklären, allerdings weisen zahlreiche neuere Daten darauf hin, daß der Mechanismus der Geschlechtsdeterminierung wesentlich komplexer ist und vom Prinzip her auch eher einem Netzwerk als einer Kaskade gleicht (Koopman 1999).
Bei einigen niederen Tieren wird das Geschlecht durch das Zahlenverhältnis von Geschlechtschromosomen zu Autosomen bestimmt. Auch bei den Marsupialiern spielt dieses Verhältnis noch eine Rolle bei der Geschlechtsentwicklung (Sharman et al. 1990). Für die Geschlechtsdeterminierung der Vögel wird ebenfalls ein dosisabhängiger Mechanismus postuliert (Nanda et al. 1999). Hier wird vermutet, daß entweder ein auf dem W-Chromosom lokalisierter dominanter Faktor die weibliche Entwicklung, oder ein auf dem Z-Chromosom lokalisierter dosisabhängiger Faktor (z. B. *Dmrt1*) die männliche Entwicklung initiiert. Wie bereits erwähnt, zeigen auch andere geschlechtsdeterminierende Gene der Säuger eine Dosisabhängigkeit. Dies wird vielfach als Überrest eines ancestralen dosisabhängigen Mechanismus der Geschlechtsdeterminierung gedeutet (Chandra 1985).

Die Entwicklung der Gonaden ist zumindest bei Reptilien, Vögeln und Säugern konserviert. Daher wird vermutet, daß auch an der Geschlechtsdeterminierung der verschiedenen Vertebraten-Klassen trotz der unterschiedlichen verwendeten Mechanismen, mindestens teilweise dieselben Gene beteiligt sind. Daher können an verschiedenen Vertebraten durchgeführte Untersuchungen auch Daten zur Aufklärung eines zugrundeliegenden gemeinsamen Mechanismus liefern.

1.4 Untersuchungen an Sonderfällen können zur Aufklärung der Geschlechtsdeterminierung beitragen

Erkenntnisse zur Identifikation und Funktion geschlechtsdeterminierender Gene oder zur Aufklärung geschlechtsdeterminierender Mechanismen gewinnt man durch Untersuchungen an Organismen, die Störungen in diesem System aufweisen, also Diskrepanzen zwischen genotypischem und phänotypischem Geschlecht zeigen. Dies sind zum einen Patienten, die entweder XY- oder XX-Geschlechtsumkehr zeigen. Pathologische Fälle von Geschlechtsumkehr findet man auch bei einigen domestizierten Säugern, wie z. B. bei Ziegen, Hunden und Schweinen (Hamerton et al. 1969, Selden et al. 1984, Johnston et al. 1958). Zum anderen gibt es verschiedene Säuger-Spezies, die natürlich vorkommende Abweichungen von der üblichen Gonosomenkonstitution XX/XY aufweisen. Im Gegensatz zur pathologisch auftretenden Geschlechtsumkehr sind diese Tiere vollständig fertil. Schließlich werden auch zu Forschungszwecken gezielt transgene oder Knock-out-Mäuse hergestellt, die Geschlechtsumkehr zeigen.
Die zwei in dieser Arbeit verwendeten ‘Modell-Systeme’ Patientinnen mit Swyer-Syndrom und *Ellobius lutescens* sollen im Folgenden vorgestellt werden.

1.4.1 Swyer-Syndrom

Der Phänotyp einer ‘reinen Gonadendysgenesie’ bei männlichem Karyotyp (OMIM #306100) wird als Swyer-Syndrom bezeichnet (Swyer und Phil 1955). Die Patientinnen sind bei Geburt unauffällig weiblich, entwickeln jedoch in der Pubertät keine sekundären Geschlechtsmerkmale und zeigen eine primäre Amenorrhoe. Da keine Differenzierung der Gonadenanlagen zu funktionsfähigen Ovarien oder Testes stattfindet, entstehen meist sogenannte Stranggonaden. Aufgrund der fehlenden Testosteron- und AMH-Wirkung entwickelt sich, mit

Ausnahme der Stranggonaden, ein unauffällig weiblicher Phänotyp. Durch das Fehlen zusätzlicher Fehlbildungen läßt sich das Swyer-Syndrom von anderen ‘Geschlechtsumkehr-Syndromen’, wie z. B. der Kampomelen Dysplasie und auch vom Turner-Syndrom abgrenzen.

Die genetische Ursache für das Swyer-Syndrom ist noch nicht geklärt. Bis jetzt sind sowohl Mutationen in *SRY*, als auch Deletionen von 9pter als Ursache für diese Form der XY-Gonadendysgenesie beschrieben. Es liegen aber auch Fälle vor, die auf einen X-chromosomalen Erbgang hinweisen (De la Chapelle 1962, Moreira-Filho et al. 1979, Wolf et al. 1980, Simpson et al. 1981). Somit muß vermutlich von einer, bezüglich ihres Entstehungsmechanismus heterogenen Erkrankung ausgegangen werden.

Bei ca. 10 - 15 % aller XY-Frauen wird die Geschlechtsumkehr durch Mutationen im *SRY*-Gen hervorgerufen (Hawkins et al. 1992). Diese stellen somit die häufigste bisher gefundene Ursache für das Swyer-Syndrom dar. Die Mutationen wurden fast ausschließlich in der HMG-Box gefunden, und es konnte gezeigt werden, daß sie zu Störungen sowohl der DNA-bindenden, als auch der DNA-biegenden Eigenschaften, also zum Funktionsverlust des Proteins führen (Harley et al. 1992; Pontiggia et al. 1994).

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß auch Deletionen im terminalen Bereich von Chromosom 9p ein Swyer-Syndrom verursachen können (Veitia et al. 1998). Die meisten Patienten mit 9p-Deletionen zeigen zusätzlich zur XY-Gonadendysgenesie eine Reihe weiterer Fehlbildungen, wie dies für Chromosomenaberrationen typisch ist. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sowohl Geschlechtsumkehr, als auch das sogenannte Monosomie-9p-Syndrom (OMIM #158170) unabhängig voneinander vorkommen. Inzwischen konnten beide Krankheiten auch getrennten Chromosomenregionen zugeordnet werden (Veitia et al. 1998). Innerhalb der für die Geschlechtsumkehr definierten Region 9p24.2 - p24.3 liegt das *DMRT1*-Gen, das aufgrund seiner testisspezifischen Expression und seiner Homologie zu geschlechtsspezifischen Genen bei anderen Spezies, ein Kandidatengen für die Geschlechtsumkehr darstellt (Raymond et al. 1998). Allerdings wurde ein direkter Nachweis hierfür bisher nicht erbracht. Bei 87 untersuchten Patienten mit XY-Geschlechtsumkehr konnte kein Zusammenhang zwischen Geschlechtsumkehr und Mutationen in *DMRT1* festgestellt werden (Raymond et al. 1999a).

Einige der beschriebenen Fälle mit familiärem Swyer-Syndrom lassen sich durch einen X-chromosomalen Erbgang erklären (Simpson et al. 1981). Hierfür wurde jedoch noch kein Kandidatengen identifiziert. Da Duplikationen der DSS-Region auf Xp zur XY-Geschlechtsumkehr führen, wurde dieses Intervall auch als Kandidatenregion für das Swyer-Syndrom in Betracht gezogen (Bardoni et al. 1994). Ursache für die durch Duplikation verursachte Geschlechtsumkehr ist eine doppelte Dosis des *DAX1*-Gens, die auf noch ungeklärte Weise mit der Funktion von *SRY* interferiert (Zanaria et al. 1994, Swain et al. 1998). Die betroffenen Patienten zeigen jedoch, abgesehen von der Geschlechtsumkehr, in der Regel zahlreiche weitere Fehlbildungen, die allerdings vermutlich Effekte der Chromosomenstörung darstellen. Mutationen in *DAX1* führen zu AHC und HHG und können bisher nicht mit Geschlechtsumkehr in Zusammenhang gebracht werden (Muscatelli et al. 1994).

1.4.2 Ellobius lutescens Th. (Ordnung Rodentia, Familie Arvicolidae)

Bei Nagetieren gibt es verschiedene Arten, die kein Y-Chromosom besitzen. Dazu gehören neben der Japanischen Landratte *Tokudaia osimensis* auch Spezies der Gattung *Ellobius* (Soullier et al. 1998, Just et al. 1995). *Ellobius lutescens* (persische Wühlmaus) ist ein in Armenien und Iran vorkommender Nager, der in unterirdischen Gangsystemen lebt. Bei dieser Spezies besitzen beide Geschlechter denselben Karyotyp 2n=17,X (Matthey 1953). Mit cytogenetischen Methoden sind keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektierbar. Das Fehlen von *SRY* und *ZFY* konnte jedoch mit molekulargenetischen Methoden nachgewiesen werden, und man geht inzwischen davon aus, daß das komplette Y-Chromosom verloren gegangen ist (Just et al. 1995, Vogel et al. 1998). Dies wirft jedoch die Frage auf, wie bei diesen Tieren die Testisdeterminierung initiiert wird. Vermutlich hat ein mutiertes Allel eines normalerweise *SRY*-nachgeschalteten Gens diese Funktion übernommen (*DSD*, downstream sex-determining gene) (Just et al. 1995).

Zunächst wurde das postulierte testisdeterminierende Gen auf Chromosom 1 vermutet, da beobachtet wurde, daß eine Variante des polymorphen Chromosoms 1 geschlechtsspezifisch vererbt wird (De La Maza und Sawyer 1976, Wolf et al. 1979). Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden, da die

Chromosomenvariante in unterschiedlichen Familien auch mit dem jeweils anderen Geschlecht auftrat (Djalali et al. 1986).

Ein Ansatz zur Überprüfung einer X-chromosomalen Vererbung des Geschlechts über Segregationsanalysen mit X-chromosomalen Markern blieb ohne Erfolg (Vogel et al. 1998). Es wurden zwei bei der Maus hoch polymorphe (CA)-Repeat-Marker verwendet, die bei *Ellobius lutescens* jedoch bei allen getesteten Individuen dieselbe Länge aufwiesen und somit keine Unterscheidung von mütterlichem oder väterlichem X-Chromosom zuließen.

Innerhalb der Gattung *Ellobius* besitzt nur die Spezies *Ellobius fuscocapillus* die übliche Gonosomenkonstitution XX/XY. Es existieren jedoch mindestens noch drei weitere Arten, bei denen kein Y-Chromosom vorliegt: *Ellobius tancrei*, *Ellobius talpinus* und *Ellobius alaicus*. Im Gegensatz zu *Ellobius lutescens* sind bei diesen Tieren in beiden Geschlechtern je zwei X-Chromosomen vorhanden (Kolomiets et al. 1991). Es ist naheliegend zu vermuten, daß ein Mechanismus zur Geschlechtsdeterminierung unabhängig von *SRY* innerhalb dieser Gattung nicht mehrmals unabhängig entstanden ist, sondern daß die vier betroffenen Spezies auseinander hervorgegangen sind. Dabei ist anzunehmen, daß zunächst das Y-Chromosom verlorengegangen ist, während der Verlust des zweiten X-Chromosoms bei *E. lutescens* ein späteres Ereignis sein dürfte. Auch das oben beschriebene Fehlen von Sequenzvarianten bei *E. lutescens* könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich um eine relativ junge Spezies handelt. Hierzu gibt es allerdings bisher noch keine gesicherten Daten.

1.5 Fragestellung

Unter der Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere versteht man den komplexen genetischen Prozeß der Entscheidung zwischen der Differenzierung der embryonalen Gonadenanlage zu entweder Testis oder Ovar. Der zugrundeliegende Mechanismus und die beteiligten Gene sind bisher nur teilweise bekannt. Untersuchungen an Organismen, die Abweichungen von der normalen Gonosomenkonstitution XX/XY, bzw. Diskrepanzen zwischen genotypischem und phänotypischem Geschlecht zeigen, könnten Antworten auf die noch offenen Fragen liefern.

Das Swyer-Syndrom wird in ca. 15 % der Fälle durch Mutationen in der kodierenden Sequenz des *SRY* Gens verursacht. Außerdem wurden auch familiäre Fälle beschrieben, die auf eine X-chromosomale Vererbung hinweisen, ohne daß jedoch ein Kandidatengen identifiziert werden konnte. Ausgehend von der Beobachtung, daß Duplikationen von *DAX1*-enthaltenden Abschnitten des kurzen Arms des X-Chromosoms zur Entstehung von XY-Geschlechtsumkehr führen können, wurde diskutiert, ob eventuell zytogenetisch nicht erkennbare Mikroduplikationen von *DAX1*, ein Swyer-Syndrom verursachen können. Auch bei Deletionen von terminalen 9p-Abschnitten, die das *DMRT1*-Gen enthalten, kann es zum Auftreten eines Swyer-Syndroms kommen, wobei eine Deletion von *DMRT1* als Ursache bisher nicht nachgewiesen ist. Bisher ist noch nicht geklärt, ob Mutationen von *DMRT1*, eventuell auch in regulatorischen Elementen außerhalb der kodierenden Sequenz, oder Mutationen in benachbarten Genen, zum Swyer-Syndrom führen können. Bei den meisten Patientinnen ist die Ursache der Krankheit unklar.
Die Beobachtung einer Familie mit drei betroffenen Töchtern bot die Chance zu analysieren, welche der oben genannten Kandidatengene bzw. Mechanismen hier für das Auftreten des Swyer-Syndroms verantwortlich sein könnten.

Beim Nager *Ellobius lutescens* zeigen beide Geschlechter denselben Karyotyp 17,X. Inzwischen konnte sowohl das Fehlen eines Y-Chromosoms, als auch des *SRY*-Gens nachgewiesen werden. Es ist jedoch bisher unklar, welches Gen die

Testisdeterminierung initiiert. Als Kandidatengene kommen in erster Linie *SOX9*, *DMRT1* und *DAX1* in Frage, da diese Gene gesicherte Funktionen bei der Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere haben. *SOX9* ist bisher das einzige Kandidatengen für eine XX-Geschlechtsumkehr, das sich durch experimentelle Daten begründen läßt. *DMRT1* wird als dosisabhängiger testisdeterminierender Faktor bei Vögeln diskutiert. Außerdem legt die konservierte testsisspezifische Expression eine wichtige Funktion auch bei der Geschlechtsdeterminierung der Säuger nahe. Ein möglicherweise ebenfalls dosisabhängiger testisdeterminierender Mechanismus bei *Ellobius lutescens* ist auch für *DAX1* denkbar. Außerdem ist die generelle Frage nach einem X-chromosomalen Mechanismus der Geschlechtsdeterminierung noch nicht beantwortet.

Um *Sox9*, *Dmrt1* und *Dax1* als Kandidatengene für die Initiierung der Testisentwicklung bei *Ellobius lutescens* zu bestätigen oder auszuschließen, sollte eine Analyse mit gekoppelten polymorphen Markern durchgeführt werden. Damit läßt sich einerseits eine mögliche geschlechtsspezifische Segregation innerhalb von Familien, oder ein geschlechtsspezifisches oder geschlechtsunabhängiges Auftreten bestimmter Marker-Allele in einer Population untersuchen. Für diesen Ansatz standen Proben von drei *Ellobius lutescens* Familien und 25 nicht-verwandten Tieren zur Verfügung.

.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roth, Karlsruhe
Agarose NA	AP Biotech, Freiburg
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
Ampicillin	Sigma, München
[γ^{32}P]ATP (10 µCi/µl, stabilisiert in wässriger Lsg.)	AP Biotech, Freiburg
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Difco, Augsburg
Bacto-Tryptone	Difco, Augsburg
Bindesilane plus one	AP Biotech, Freiburg
Biotin-16-dUTP	Boehringer, Mannheim
Biotinyliertes Anti-Avidin	Vector, Burlingame (USA)
Bromphenolblau	Sigma, München
BSA, DNAse frei	AP Biotech, Freiburg
BSA	Sigma, München
CDP-Star™ detection reagent	AP Biotech, Freiburg
Colcemid	Seromed, Berlin
[α^{32}P]dCTP (10 µCi/µl, stabilisiert in wässriger Lsg.)	AP Biotech, Freiburg
DEAE Sephacel®	AP Biotech, Freiburg
DMSO	Sigma, München
dNTP Polymerization Mix	AP Biotech
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll	AP Biotech, Freiburg
FITC-Avidin	Vector, Burlingame (USA)
Harnstoff NF	Roth, Karlsruhe
Heringssperma DNA	Sigma, München
8-Hydroxy-Chinolin	Sigma, München

Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Seromed, Berlin
Long Ranger™	FMC, Rockland, USA
NZYDT	GIBCO-BRL, Eggenstein
PBS	Seromed, Berlin
Phenol	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma, München
PVP	Sigma, München
Repel Silane	AP Biotech, Freiburg
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lsg. 40%	Roth, Karlsruhe
Sephadex® G50	AP Biotech, Freiburg
TEMED	BioRad, München
TRIS ultrapure	USB, Cleveland, USA
X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
Yeast Extract	GIBCO-BRL, Eggenstein

2.1.2 Kits (Reagenziensysteme)

AlkPhos Direkt™ Labelling Kit	AP Biotech, Freiburg
Cy5-AutoRead™ Kit	AP Biotech, Freiburg
PASSPORT™ Mutation Scanning Kit	AP Biotech, Freiburg
QIAamp® Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® 8-Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN® Plasmid Midi / Maxi Kit	Qiagen, Hilden
T7 Quick Prime® Kit	AP Biotech, Freiburg
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza GTP	AP Biotech, Freiburg
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Groningen, NL
Vectorette™ II Starter Pack	Genosys, Cambridge, UK

2.1.3 Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg / ml in Aqua bidest.

Chloroform / Isoamylalkohol: 24:1

Denhardt's Lösung:
0,02% Ficoll
0,02% BSA
0,02% PVP

Ethidiumbromid-Lösung: 1 µg / ml in Aqua bidest.

Fragmentierte *Ellobius*-DNA: ca. 1 mg / ml in TE 10/1;
durch Ultraschallbehandlung fragmentiert

Heringssperma-DNA: 10 mg / ml in H_2O, durch Autoklavieren fragmentiert

HOM-Puffer:
100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl, pH 7,6
10 mM EDTA-Na_2

IPTG: 100 mM in Aqua bidest., sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung: 25 mg / ml in Aqua bidest.

Lyse-Puffer für die Isolation von DNA aus Blut:
10 mM Tris-HCl
400 mM NaCl
2 mM EDTA-Na_2
pH-Wert auf 8,2 einstellen

$MgCl_2$-Mix (10x) für PCR:

0,1	M	Tris-HCl, pH 8,5
0,5	M	KCl
0,1	%	Gelatine
10 / 15 / 20 / 25	mM	$MgCl_2$

Phenol-Lösung (pH 7,6): Phenol wurde mit 50% HOM-Puffer äquilibriert, der pH-Wert wurde mit NaOH eingestellt und 0,1% (w/v) 8-Hydroxy-Chinolin zugesetzt.

Prähybridisierungs-/Hybridisierungslösung (radioaktiv markierte DNA-Sonden):

5	x	SSPE
5	x	Denhardt's Lösung
0,5	%	SDS
100	µg / ml	Heringssperma-DNA

Prähybridisierungs-/Hybridisierungslösung
(radioaktiv markierte einzelsträngige Oligonukleotide):

5	x	SSPE
3	%	SDS

Probenpuffer für Agarosegele (nach Sambrook et al. 1989):

50	% (w/v)	Saccharose
0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
0,1	% (w/v)	Xylencyanol FF
in 10	mM	Tris-HCl, pH 7,6

Probenpuffer für Polyacrylamidgele:

80	%	Formamid
0,1	% (w/v)	Bromphenolblau
0,1	% (w/v)	Xylencyanol FF
10	mM	EDTA

Proteinase K: 10 mg / ml in SE-Puffer

10 x Puffer für Nick Translation:

0,5	M	Tris-HCl, pH 7,5
50	mM	$MgCl_2$
0,5	mg / ml	BSA

SE-Puffer (pH 8,0):

75 mM	NaCl
25 mM	EDTA-Na_2

Sephadex G 50-Suspension: Suspension in TE 10/1, autoklaviert

SSC-Puffer pH 7,0 (20x):
3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat-Dihydrat

SM-Puffer:
0,05 M Tris-HCl, pH 7,6
0,1 M NaCl
10 mM $MgSO_4$
100 mg / l Gelatine
autoklavieren

SSPE-Puffer (20x):
3 M NaCl
0,6 M $NaH_2PO_4xH_2O$
0,02 M EDTA-Na_2
ad 1000 ml Aqua bidest.
pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen, autoklavieren

TBE-Puffer (pH 8,0) (10x):
0,8 M Tris
0,8 M Borsäure
20 mM EDTA-Na_2, pH 8,0

TE-Puffer (10x):
100 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA-Na_2, pH 8,0

Waschpuffer für Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden:

Waschpuffer 1:	2	x	SSC
	0,1	%	SDS
Waschpuffer 2:	0,2	x	SSC
	0,1	%	SDS
Waschpuffer 3:	0,1	x	SSC
	0,1	%	SDS

X-Gal:
20 mg / ml in Dimethylformamid

2.1.4 Medien zur Kultivierung von Bakterien und Bakteriophagen

NZYDT-Medium: 21,1 g NZYDT
ad 1000 ml Aqua bidest.
autoklavieren

NZYDT-Agar: NZYDT-Medium + 15 g / l Agar
autoklavieren

Top-Agar:

5	g	Yeast Extract
5	g	NaCl
0,94	g	$MgCl_2$
7	g	Agarose
ad 1000	ml	Aqua bidest.

pH-Wert auf 7,5 einstellen, autoklavieren

SOB-Medium:

20	g	Casein Hydrolysat
5	g	Yeast Extract
10	mM	NaCl
2,5	mM	KCl
ad 1000	ml	Aqua bidest.

pH-Wert auf 7,5 einstellen, autoklavieren
Vor Gebrauch Zusatz von:

10	mM	$MgCl_2$
10	mM	$MgSO_4$

SOB-Agar: SOB-Medium + 15 g / ml Agar

2.1.5 Bakterien- und Bakteriophagen- Stämme

ExAssist® interference-resistent helper phage	Stratagene, Heidelberg
LE 392	ATCC, Rockville, USA
TOP 10 One Shot® Cells	Invitrogen, Groningen, NL
XL1 Blue MRF'	Stratagene, Heidelberg
XLOLR	Stratagene, Heidelberg

2.1.6 Vektoren

pBlueskript® II SK(+/-)	Stratagene, Heidelberg
pCR®2.1-TOPO®	Invitrogen, Groningen, NL

2.1.7 DNA-Bibliotheken

Ellobius lutescens genomische DNA-Bibliothek	genomische DNA eines männl. *Ellobius lutescens* kloniert in einem ZAP Express® Vektor; Abteilung HumangenetiK, Ulm

2.1.8 DNA-Sonden

1Aa (*DAX1*, Mensch)	PCR-Produkt, kloniert
$(CA)_{11}$-Oligonukleotid	Interactiva, Ulm
eDAX1 (*Dax1*, Ellobius)	PCR-Produkt, kloniert
eDMT1 (*Dmrt1*, Ellobius)	PCR-Produkt, kloniert
hDMT1 cDNA (*DMRT1,* Mensch)	Plasmid zur Verfügung gestellt von PD Dr. G. Scherer, Freiburg
hDMT1MH1 (*DMRT1*, Mensch)	PCR-Produkt, kloniert
pC63 (Sonde v. Chromosom 17, Mensch)	Plasmid; ATCC, Rockville, USA
pUC *SOX9* 4.1 cDNA (*SOX9*, Mensch)	Plasmid zur Verfügung gestellt von Dr. P. Südbeck, Freiburg

2.1.9 Längenstandards

λ/*Hin*dIII	AP Biotech, Freiburg
1 kb ladder	Stratagene, Heidelberg
ΦX-174-RF/*Hae*III	Promega, Mannheim
ALFexpress™ Sizer 50 - 500, 100, 300	AP Biotech, Freiburg

2.1.10 Enzyme

DNA-Polymerase I	Boehringer, Mannheim
DNase I	Boehringer, Mannheim
Pepsin	Sigma, München
Proteinase K	Sigma, München
Restriktionsendonucleasen	NEB, Frankfurt
RNase A	Sigma, München
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt
T4 Polynucleotidkinase	AP Biotech, Freiburg
T7 DNA Polymerase	AP Biotech, Freiburg
Taq DNA Polymerase	AP Biotech, Freiburg
Trypsin 2,5%	Seromed, Berlin

2.1.11 *Ellobius lutescens*

Tiere aus dem Iran (zur Verfügung gestellt von Prof. Farhoud, Teheran, IR)

Bezeichnung	Geschlecht	Eltern	zur DNA-Isolation verwendetes Gewebe
Ello1	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello3	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello4	♀	- / -	Niere
Ello5	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello8	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello9	♀	- / -	Leber
Ello11	♂	- / -	Niere
Ello14	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello16	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello17	♀	- / -	Niere
Ello18	♂	- / -	Niere
Ello19	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello20	♂	- / -	Leber
Ello23	♂	- / -	Niere
Ello24	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello27	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello32	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello33	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello34	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello35	♀	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello37	♂	- / -	kultivierte Fibroblasten
Ello41	♂	- / -	Niere
Ello48	♀	- / -	Leber
Ello42	♂	Ello41 / Ello48	kultivierte Fibroblasten
Ello44	♀	Ello41 / Ello48	kultivierte Fibroblasten

Tiere aus Armenien (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Akhverdyan, Uppsala, S)

Bezeichnung	Geschlecht	Eltern	zur DNA-Isolation verwendetes Gewebe
24077	♂	24085 / 24083	Niere
24078	♂	24085 / 24083	Niere
24079	♀	24085 / 24083	Niere
24080	♂	24085 / 24083	Niere
24083	♀	- / -	Niere
24084	♂	24085 / 24083	Niere
24085	♂	- / -	Niere
24087	♂	24085 / 24083	Niere
24370	♀	24085 / 24083	Niere
24371	♀	24085 / 24083	Niere
24372	♀	24085 / 24083	Niere
24373	♀	24085 / 24083	Niere
24379	♀	24087 / 24398	Niere
24380	♂	24087 / 24398	Niere
24381	♀	24087 / 24398	Niere
24382	♂	24087 / 24398	Niere
24383	♀	24087 / 24398	Niere
24384	♀	24085 / 24083	Niere
24397	♀	24087 / 24398	Niere
24398	♀	24085 / 24083	Niere
24374	♂	- / -	Niere
24375	♀	- / -	Niere
24376	♀	24374 / 24375	Niere
24377	♀	24374 / 24375	Niere
24086	♀	24374 / 24375	Niere

2.1.12 Patienten mit Swyer-Syndrom: Familie mit drei betroffenen Töchtern

EDTA-Blut bzw. histologische Präparate der Gonaden wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. A. Sinkus, Kaunas, LT.

Labor-bezeichnung	Patientin / Eltern	zur DNA-Isolation verwendetes Gewebe
VC	Patientin, Swyer-Syndrom	histol. Präp. der Gonaden
AC	Patientin, Swyer-Syndrom	EDTA-Blut
LC	Patientin, Swyer-Syndrom	EDTA-Blut
VIC	Vater von VC, AC, LC	EDTA-Blut
LIC	Mutter von VC, AC, LC	EDTA-Blut

2.1.13 PCR-Primer und PCR-Bedingungen

Die Synthese der Primer erfogte bei Interactiva, Ulm oder AP Biotech, Freiburg.

Die Positionen geben die Lage des 5'-Endes des Primers auf der angegebenen Referenzsequenz an.

Primer zur Amplifikation der kodierenden Region des humanen *SRY* (GenBank Accession Nr. L10102):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
SRYA-f / 1886	AATACATTGTCAGGGTACTAG	[$MgCl_2$]=2mM; 30 Zyklen
SRYA-r / 2744	ATCGTAAAAAGGAGCATCTAG	94°C/1';58°C/1';72°C/1'

Primer zur Amplifikation der humanen *DMRT1*-Sonde hDMT1MH1 (GenBank Accession Nr. AL136365):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
DMT1MH1-f / 19727	GAGCTCGAATTCCACCGTCGGAAGCCCCTC	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen
DMT1MH1-r / 20008	GAGCTCGAATTCTTGCACTGGCAGTCGCGC	94°C/30'';54°C/30'';72°C/45''

Primer zur Amplifikation der *Dax*1-Sonde eDax1 bei *Ellobius lutescens* durch 'Nested PCR' (GenBank Accession Nr. U31929):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
MM2-f / 2388	AGTACTTGCCCTGCTTCCAG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 40 Zyklen
MM2-r / 2750	GGTCTGGGTTAAAGAGCACG	94°C/30'';50°C/30'';72°C/1'
MM3-f / 2421	ATCAGCAGCTGGTGCTGGT	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
MM3-r / 2701	TGTCAATGTTCAGACTCCAGCA	94°C/30'';56°C/30'';72°C/1'

Primer zur Amplifikation der *Dmrt1*-Sonde eDMT1 bei *Ellobius lutescens* durch 'Nested Vectorette PCR' (GenBank Accessin Nr. AL136365):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
DMT1d1N-r / 71871	TGGTAGAAGCTGCTGTAGTAGGTN	[$MgCl_2$]=1,5mM; 40 Zyklen
Vectorette-Primer	Sequenz unbekannt	94°C/1';54°C/1'/72°C/3'
DMT1d2N-r / 71825	GAGCTCGAATTCTGTTCTCCACATGCCCTN	[$MgCl_2$]= 1,5mM; 40 Zyklen
Nested-Vectorette-P.	Sequenz unbekannt	94°C/1';54°C/1'/72°C/3'

Primer zur Amplifikation von Intron 1 des *Sox9* Gens bei *Ellobius lutescens* (GenBank Accession Nr. AC007461):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
SOX9I1-f / 63490	ACGCCGAGCTCAGCAAGAC	$[MgCl_2]$=1,5mM; 30 Zyklen
SOX9I1-r / 62480	GGGTGGTCCTTCTTGTGCTG	94°C/30'';58°C/30''/72°C/45''

Primer zur Amplifikation von Intron 2 des *Sox9* Gens bei *Ellobius lutescens* durch 'Nested PCR' *lutescens* (GenBank Accession Nr. AC007461):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
SOX9direkt-f / 62506	CCGGATGCAGCACAAAAAGGAC	$[MgCl_2]$=2,5mM; 30 Zyklen
SOX9direkt-r / 61514	CCGTTGGGTGGCAGGTATTGGT	94°C/30'';50°C/30'';72°C/1'
SOX9I2-f / 62487	GACCACCCGGATTACAAGTACC	$[MgCl_2]$=1mM; 30 Zyklen
SOX9I2-r / 61584	TCAGCTCGCCGATGTCCAC	94°C/30'';63°C/30'';72°C/70''

M13-Primer zur Amplifikation von Plasmid-Inserts:

Bezeichnung	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
M13universal	GTAAAACGACGGCCAG	$[MgCl_2]$=1mM; 35 Zyklen
M13revers	CAGGAAACAGCTATGAC	95°C/45'';56°C/45'';72°C/1'

Cy5-markierte Primer zur Amplifikation von *Sox9*-Fragmenten für EMD bei *Ellobius lutescens* (eSox9I1, eSox9I2, s. Anhang):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingunge
eSox9I1/1-f / 569	AGGCAAGAATTAGGGAAAGC	$[MgCl_2]$=2,5mM; 30 Zyklen
eSox9I1/1-r / 142	TCCTCCACGAAGGGTCTC	94°C/30'';48°C/30'';72°C/45''
eSox9I1/2-f / 528	ACGCCCCTACCGGTTCTCAG	$[MgCl_2]$=2,5mM; 30 Zyklen
eSox9I1/2-r / 951	GTGCTCAGGACCGCAGGTG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/45''
eSox9I2/1-f$^{*/+}$ / 447	CCTCACCCCCAAAAGCACAC	$[MgCl_2]$=2,5mM; 30 Zyklen
eSox9I2/1-r$^{*/+}$ / 15	CAGCTCGCCGATGTCCAC	94°C/30'';58°C/30'';72°C/45''
eSox9I2/2-f / 896	GACCACCCGGATTACAAGTACC	$[MgCl_2]$=2,5mM; 30 Zyklen
eSox9I2/2-r / 430	GTGCTTTTGGGGGTGAG	94°C/30'';48°C/30'';72°C/45''

* Primer wurden auch unmarkiert zur Amplifikation des Fragments zur Klonierung und/oder Sequenzierung verwendet.

$^{+}$ Primer wurde auch zur Sequenzierung des Fragments verwendet

Cy5-markierte Primer zur Amplifikation von *Dax1*-Fragmenten für EMD bei *Ellobius lutescens* (PeDax1-21B, s. Anhang):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
eDAX1.1-f / 6326	CCTGAGCTACTTGCTTTTGC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.1-r / 5778	ACCCAGGTAAGCATGACAGC	94°C/45'';60°C/45'';72°C/1'
eDAX1.2-f / 4678	TTGCGCTCATCAGTAGATTG	[$MgCl_2$]=1,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.2-r / 4322	TGCCCCAGGTTCACTACTC	94°C/45'';52°C/45'';72°C/1'
eDAX1.4-f / 76	AAAAACCTAGAAGACTCAGC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.4-r / 512	CTTAATTTGCATTGTCCTG	94°C/45'';55°C/45'';72°C/1'
eDAX1.5-f / 486	TTAGACACCAGGACAATGC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.5-r / 982	AATCATCATGGCTTATTCTG	94°C/45'';53°C/45'';72°C/1'
eDAX1.6-f / 957	GTCAGACAGAATAAGCCATG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.6-r / 1396	TAGATCCTCAAAAAATGTGC	94°C/30'';52°C/30'';72°C/1'
eDAX1.7-f / 1327	GTTGCCAGATTATGATGTTC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.7-r / 1903	GGGTTGTGTGATCTACGAG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/1'
eDAX1.8-f / 1891	GATCACACAACCCAGGTG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.8-r / 2319	CAATCATAACGCTGTCTCTC	94°C/45'';55°C/45'';72°C/1'
eDAX1.9-f 7 2210	ACCCCTGAGTAGTTTGAATC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.9-r / 2652	AATCCACCTACATAATCCAG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/1'
eDAX1.10-f$^{*/+}$ / 2577	TGAAAGAGGTTTTGTAGATG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.10-r$^{*/+}$ / 3149	TTACAGTCTTTTTGCCATAG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/1'
eDAX1.11-f / 3090	ATCCATATCAAGCCTTCAAG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.11-r / 3569	AGGAAAGGGGACTAGAACAC	94°C/30'';50°C/30'';72°C/1'
eDAX1.12-f / 3646	CCAGACGGTTGAATAAAGAG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen
eDAX1.12-r / 4248	CTTAAACGGGAAAATAGTCC	94°C/30'';54°C/45'';72°C/1'
eDAX1.13-f / 4283	ACGTCCAGAGGCCAGAGTTG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDAX1.13-r / 4819	AAGCAGCAGCGGTACAGGAG	94°C/30'';56°C/30'';72°C/1'

* Primer wurden auch unmarkiert zur Amplifikation des Fragments zur Klonierung und/oder Sequenzierung verwendet.

$^{+}$ Primer wurde auch zur Sequenzierung des Fragments verwendet

Cy5-markierte Primer zur Amplifikation von *Dmrt1*-Fragmenten für EMD bei *Ellobius lutescens* (PeDmt1-11A, s. Anhang):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')	PCR-Bedingungen
eDMT1.1-f* / 1047	TGTTCTCCACATGCCCTCTGC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.1-r* / 694	CAGGGGTGTGTGAGGTACGTC	94°C/30'';58°C/30'';72°C/45''
eDMT1.2-f / 791	CTGAAGACCCTTGGCCTGTG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.2-r / 349	CCTGATGAATGTGATGGGCTG	94°C/30'';60°C/30'';72°C/45''
eDMT1.3-f / 1384	CCAGATCAGCACCCATGTAG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.3-r / 1774	TACTGGGCCATCACAAACAC	94°C/30'';60°C/30'';72°C/45''
eDMT1.5-f / 2110	CTCAGTAAGGGTTTGGTTGC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.5-r / 2463	TGGGGTTAGAGAAGTGGAGAG	94°C/30'';54°C/30'';72°C/45''
eDMT1.6-f / 2429	ACGTGGATGTATGTCTCTCC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.6-r / 2903	AAATCCCAAGAGCAAAATG	94°C/30'';54°C/30'';72°C/45''
eDMT1.7-f / 2885	CATTTTGCTCTTGGGATTTC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.7-r / 3280	GGTTAAAGGAGTGCATCACC	94°C/30'';50°C/30'';72°C/45''
eDMT1.8-f / 3241	TTTAAACAAGCCAGGACCTG	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.8-r / 3617	CCACAGGTTTAGAGGACGTG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/45''
eDMT1.9-f / 3667	GTGATGTAGCCCTGCCTCTC	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen
eDMT1.9-r / 4154	GCCACAGCAGGACAGAAGG	94°C/30'';52°C/30'';72°C/45''

* Primer wurden auch unmarkiert zur Amplifikation des Fragments zur Klonierung und/oder Sequenzierung verwendet.

Polymorphe STS-Marker von Chromosom 9p für Segregationsanalyse (GDB):

Bezeichnung	Position (Mbp) [+]	PCR-Bedingungen
D9S129	5,92-8,47	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
D9S1779	5,05-10,16	[$MgCl_2$]=1,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
D9S288	8,79-11,54	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';54°C/30'';72°C/30''
D9S1813	9,43-9,73	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';54°C/30'';72°C/30''
D9S132	10,62-11,19	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';54°C/30'';72°C/30''
D9S286	13,22-14,98	[$MgCl_2$]=1,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
D9S157	20,61-20,80	[$MgCl_2$]=1,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''

[+] Positionsangaben aus GDB.

X-chromosomale, polymorphe STS-Marker für Segregationsanalyse (GDB):

Bezeichnung	Position (kbp) +	PCR-Bedingungen
DXS16	15500	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS1226	22794	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS365	25750	[$MgCl_2$]=2,0mM; 35 Zyklen; 94°C/30'';50°C/30'';72°C/30''
DSX989	27400	[$MgCl_2$]=1,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS451	27700	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS1202	30150	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS1061	30500	[$MgCl_2$]=2,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS8039	31345	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS1218	32200	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
AFMa082xb9	33200	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DMD-50	34400-36600	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/45'';50°C/45'';72°C/45''
DXS1214	34750	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS1068*	40141	[$MgCl_2$]=1,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS993	41250	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS8025	42250	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
MAOB.PCR1	44128-44148	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';52°C/30'';72°C/30''
DXS1003*	45800	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
AR.PCR1	64156-64176	[$MgCl_2$]=2,5mM; 35 Zyklen; 94°C/45'';61°C/30'';72°C/30''
DXS227	74100	[$MgCl_2$]=1,0mM; 32 Zyklen; 94°C/30'';57°C/30'';72°C/30''
DXS990	94900	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS1059	114060	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS425	119500	[$MgCl_2$]=2,0mM; 35 Zyklen; 94°C/30'';50°C/30'';72°C/30''
DXS1047	125225	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS8041	131898	[$MgCl_2$]=2,0mM; 35 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS1205	141500	[$MgCl_2$]=2,0mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
DXS1227	142000	[$MgCl_2$]=1,5mM; 30 Zyklen; 94°C/30'';55°C/30'';72°C/30''
BGN.PCR1	157012-157032	[$MgCl_2$]=1,5mM; 37 Zyklen; 94°C/30'';64°C/30'';72°C/30''

* Primer mit Cy5-Markierung für Fragment-Analyse am ALFexpress.

+ Position nach 'Integrated 3', MPI, Berlin, (http://ixdb.molgen.mpg.de)

2.1.14 Sequenzierprimer

Cy5-markierte Primer zur Sequenzierung des humanen *SRY* Gens:

Bezeichnung	Sequenzen (5'-3')
SRYI-f (= XES10, nach Berta et al. 1990)	GGTGTTGAGGGCGGAGAAATGC
SRYI-r (= XES11, nach Berta et al. 1990)	GTAGCCAATGTTACCCGATTGTC

Cy5-markierte Primer zur Plasmid-Sequenzierung:

Bezeichnung	Sequenzen (5'-3')
M13 universal	GTAAAACGACGGCCAG
M13 revers	CAGGAAACAGCTATGAC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC

Cy5-markierte Primer zur Sequenzierung des PeDAX1-21B-Inserts (PeDax1-21B, s. Anhang):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')
eDAX1S1 / 5599	CGCCTGGTGGTGAGCATCCT
eDAX1S2 / 4889	ACTTGACTGCTTGGCGCTGG
eDAX1S3c / 4164	GAAAACGTTCGGAGGCTGAG
eDAX1S5 / 735	CAAAGGAATCAAATTCAGTG
eDAX1S6 / 1488	CTAAGCATCGTTTAACTAAG
eDAX1S7 / 1886	TCGTAGATCACACAACCCAG
eDAX1S8 / 2577	TGAAAGAGGTTTTGTAGATG
eDAX1S9 / 3090	ATCCATATCAAGCCTTCAAG
eDAX1S10 / 3646	CCAGACGGTTGAATAAAGAG

Cy5-markierte Primer zur Sequenzierung des PeDMT1-11A-Inserts (PeDmt1-11A, s. Anhang):

Bezeichnung/Position	Sequenzen (5'-3')
eDMT1S1 / 1384	CCAGATCAGCACCCATGTAG
eDMT1S2 / 2110	CTCAGTAAGGGTTTGGTTGC
eDMT1S3 / 2885	CATTTTGCTCTTGGGATTTC
eDMT1S4 / 3667	GTGATGTAGCCCTGCCTCTC
eDMT1S5N / 4353	TCTGGGCTTTTTTACCTTTC
eDMT1S6 / 5097	TCACTGGGTCTGCAGCAAAC

2.1.15 Geräte

ALFexpress™ Sequencer	AP Biotech, Freiburg
Bildanalyse-System	
ISIS 3 V.2.44	Metasystems, Unterlussheim
Elektroelutionskammer:	
Biotrap	Schleicher&Schuell, Dassel
Elektroporator:	
BTX® Electro Cell Manipulator 600	AGS, Heidelberg
Gelkammern:	
GNA-200 Submarine Unit	AP Biotech, Freiburg
Macrophor	AP Biotech, Freiburg
Homogenisator:	
FastPrep® FP120	Q-Biogene, Heidelberg
Hybridisierungsofen	Bachofer, Reutlingen
Kamera	
Kodak DC 120	Kodak, Stuttgart
Mikroskop	
Axiophot-Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
PCR-Maschinen:	
Corbett FTS-960	LTF, Konstanz
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Phosphor Imager:	
Phosphor Imager SF	MolecularDynamics, Krefeld
Photometer:	
Gene Quant	AP Biotech, Freiburg
Double-Beam Spectrophotometer UV210A	Shimadzu, Stuttgart
Rotoren für Sorvall®-Zentrifuge:	
GSA, SS 34, HB 6	Kendro, Hanau
Stromversorger:	
Consort E425, Consort E722	LTF, Konstanz
Variopipetten	Abimed, Langenfeld
Zentrifugen:	
Biofuge fresco, pico; Megafuge 1,0 RS	Kendro, Hanau
Sorvall® RC 5B	Kendro, Hanau

2.1.16 Computer-Programme

Cyrillic	Cherwell Scientific Publishing, Frankfurt
EHplus	Xie und Ott 1993; Zhao et al. 2000
CHIPROB (Utility programs for analysis of genetic linkage)	©Ott 1988
Filter	©G. Vogel, Ulm; Geerkens et al. 1995
Fragment Analyzer	AP Biotech, Freiburg
Fragment Manager	AP Biotech, Freiburg
GCG	Genetics Computer Group, Madison, USA
MLINK (LINKAGE Package)	Lathrop et al. 1984
Oligo™ 4.0 Primer Analysis Software	Medprobe, Oslo, N
Sequence Analyzer	AP Biotech, Freiburg

2.1.17 Sonstiges

Cronex Verstärkerfolien	DuPont, Bad Homburg
Elektroporationsküvetten (0,2 cm)	BioRad, München
Hybond™ N+ Nylonmembran	AP Biotech, Freiburg
MicroSpin™ Columns S-400 HR	AP Biotech, Freiburg
Röntgenfilme Fuji-RX	Fuji, Düsseldorf

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden zur DNA-Isolation

2.2.1.1 DNA-Isolation aus Blut (nach Miller et al. 1988)

Zum Lysieren der Erythrozyten wurden 10 ml EDTA-Blut mit 30 ml Lysepuffer versetzt und dann 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (1000 rpm / 10 min. / 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer resuspendiert. Dann wurde für 10 min. auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (s. o.). Das Pellet wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert. Dieser Ansatz wurde mit 500 µl 10% SDS und 30 µl Proteinase K (10 mg / ml) versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert.
Zum Ausfällen der Proteine wurden 1,5 ml einer gesättigten (6M) NaCl-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde kräftig gemischt und dann zentrifugiert (4500 rpm / 15 min. / 20 °C). Anschließend wurde der DNA-haltige Überstand abgenommen. Falls der Überstand nicht klar war, wurde erneut gemischt und zentrifugiert. Die DNA wurde mit 2 Volumina Ethanol (RT) gefällt, mit einem Plastikspatel entnommen und in einem geeigneten Volumen TE 10/1 gelöst.

2.2.1.2 DNA-Isolation aus tiefgefrorenem Gewebe

(modifiziert nach Miller et al. 1988)

Gewebestücke von ca. 200 mm^3 Volumen wurden in 500 µl SE-Puffer in FastPrep Tubes mit Keramik-Matrix überführt und im FP120 FastPrep Cell Disruptor (Q-BIOGENE) homogenisiert (Speed: 6,5 / 20 sec.). Anschließend wurde der Ansatz mit SE-Puffer auf 5 ml aufgefüllt, mit 500 µl 10% SDS und 30 µl Proteinase K (10 mg / ml) versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.3 DNA-Isolation aus kultivierten Fibroblasten

(modifiziert nach Miller et al. 1988)

Fibroblasten (ca. 1 - 2 x 10^7 Zellen) wurden abtrypsiniert und einmal mit PBS gespült. Das Zellpellet wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, mit 500 µl 10% SDS und 30 µl Proteinase K (10 mg / ml) versetzt und über Nacht bei 55 °C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 2.2.1.1 beschrieben.

2.2.1.4 DNA-Isolation aus histologischen Präparaten

Histologische Schnitte wurden vom Objektträger abgelöst, zunächst in Xylol und Ethanol gespült, um Reste des Eindeckmittels zu entfernen und anschließend wieder getrocknet. Zur DNA-Isolation wurde der QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.1.5 Plasmid-Präparation (nach Birnboim und Doly 1979)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte je nach eingesetztem Kulturvolumen über den QIAprep 8 Plasmid Kit (QIAGEN), bzw. über Plasmid Midi- oder Maxi-Kits (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers.
Die Bakterien wurden in SOB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums über Nacht kultiviert. Nach alkalischer Lyse der Bakterienzellen, Ausfällen und Abtrennung von Zellwandpartikeln und chromosomaler DNA durch Zentrifugation, wurde die Plasmid DNA über eine Säule gereinigt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend durch Zugabe von 0,7 Volumina Isopropanol aus dem Eluat ausgefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 400 µl TE 10/1 gelöst. Um eine höhere DNA-Konzentration zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA mit 2 Volumina Ethanol 100% (-20 °C) erneut gefällt und in einem geeigneten Volumen TE 10/1 aufgenommen.

2.2.1.6 Insert-Präparation aus Plasmiden

Plasmid-Inserts, die als Hybridisierungssonden verwendet werden sollten, wurden durch Restriktionsendonukleasen aus dem Plasmid ausgeschnitten. Dazu wurden 30 - 40 µg der jeweiligen Plasmid-DNA für ca. 6 h mit 1 - 5 U / µg DNA des entsprechenden Enzyms inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der entstandenen Fragmente in 1%-iger NA-Agarose (AP BIOTECH) wurde die Insert-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die Insert-DNA mittels Elektroelution aus dem Gel extrahiert. Hierfür wurde das Elektroseparationssystem ‘Biotrap’ (SCHLEICHER & SCHUELL) entsprechend den Angaben der Herstellers eingesetzt. Nach der Elution wurde die Probe mit Phenol und Chloroform / Isoamylalkohol (4%) gereinigt und durch Zusatz von 1/30 Volumina 3M Natriumacetat (pH 5,5) und 2 Volumina Ethanol 100% (-20°C) gefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert, im Vakuumkonzentrator getrocknet und anschließend in TE 10/1 gelöst.

2.2.1.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

2.2.1.7.1 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte der DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Eine OD-Einheit entspricht bei der Messung von DNA einer Konzentration von 50 µg / ml. Bei zusätzlicher Bestimmung des Proteingehalts anhand der OD_{280} kann das Verhältnis OD_{260} / OD_{280} als Maß für die Reinheit der extrahierten DNA angegeben werden.

2.2.1.7.2 Bestimmung der DNA-Konzentration auf einer Ethidiumbromidplatte

Die Konzentration von DNA-Proben, von denen nur ein geringes Volumen zur Verfügung stand, oder bei denen eine sehr geringe Konzentration erwartet wurde, wurde mittels Ethidiumbromid-Platte bestimmt. Dazu wurde 1 µl der Probe auf die Platte aufgetropft. Nach ca. 30 - 60 min. Inkubationszeit wurde die Fluoreszenz der Probe bei UV-Licht mit einer Eichreihe aus definierten Mengen DNA des Bakteriophagen Lambda verglichen.

2.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) und auf PCR basierende Methoden

Die PCR-Technik (Saiki et al. 1988) dient der automatisierten Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten. Voraussetzung hierfür ist, daß flankierende DNA-Sequenzen bekannt sind und als Oligonukleotid-Primer in die Reaktion eingesetzt werden können. Da der zyklische Ablauf der PCR ein wiederholtes Aufheizen auf 95°C erfordert, wird für die PCR ein thermostabiles Enzym, wie beispielsweise die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) verwendet.
Die PCR-Amplifikation von DNA-Abschnitten stellt die Grundlage für zahlreiche weitere Analyse-Methoden dar.

2.2.2.1 Primer

Primersequenzen wurden entweder aus GDB (Genomic Database, Baltimore, USA) entnommen, oder wurden auf den zu analysierenden Sequenzen mit der Oligo 4.0 Primer Analysis Software (Medprobe, Oslo) selbst definiert.
Die Primersynthese erfolgte durch die Firmen AP BIOTECH, Freiburg, oder INTERACTIVA, Ulm.

2.2.2.2 PCR Bedingungen

PCR-Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit einem Standard-Ansatz, sowie einem Standard-Amplifikationsprogramm durchgeführt, bei denen in der Regel nur die Magnesiumchlorid-Konzentration, die Annealing-Temperatur und die Polymerisationsdauer variiert wurden. In einigen Fällen wurde die Anzahl der Zyklen erhöht, um eine höhere Konzentration des PCR-Produktes zu erzielen. Für PCRs, die unter Standard-Bedingungen unspezifische Nebenprodukte lieferten, wurde ein modifizierter ('Spezial'-) Ansatz verwendet.

Standard-Ansatz:	1 - 2,5	mM	$MgCl_2$-Mix
	200	µM	dNTP-Mix (20 mM)
	100	nM	Primer 1 (10 µM)
	100	nM	Primer 2 (10 µM)
	0,07	U / µl	*Taq*-Polymerase (5U / µl)
	50 - 100	ng / Ansatz	DNA
	nach Bedarf		Aqua ad injectabilia

'Spezial'-Ansatz:	67	mM	Tris pH8,8
	10	%	DMSO
	0,16	mg / ml	BSA
	1,5	mM	$MgCl_2$
	16,6	mM	$(NH_4)_2SO_4$
	7,0	mM	β-Mercaptoethanol
	200	nM	Primer 1 (10 µM)
	200	nM	Primer 2 (10 µM)
	0,8	mM	dNTP-Mix (20 mM)
	0,05	U / µl	*Taq*-Polymerase (5U / µl)
	100	ng / Ansatz	DNA
	nach Bedarf		Aqua ad injectabilia

Standard-Amplifikationsprogramm (30 / 35 Zyklen):	95 °C	30 s
	variabel	30 s
	72 °C	30 - 70 s

2.2.2.3 Elektrophorese und Southern Blot von PCR-Produkten

Nach der PCR wurden aus jedem Ansatz 10 - 15 µl entnommen und zur Überprüfung von Fragmentlänge, Konzentration und / oder Spezifität der Amplifikation in einem 2% igen Agarosegel aufgetrennt. Wenn die Identität der amplifizierten Fragmente durch Hybridisierung verifiziert werden sollte, wurden die aufgetrennten PCR-Produkte durch alkalischen Transfer (Sambrook et al. 1989) auf eine Hybond N+ Nylonmembran (AP BIOTECH) übertragen. Da es sich grundsätzlich um DNA-Fragmente handelte, die kürzer als 2 kbp waren, wurde hierbei auf den Depurinierungsschritt verzichtet.

2.2.2.4 Nested PCR

Unter einer ‘Nested PCR’ versteht man die Reamplifikation eines PCR-Produktes mit Primern, die an dem bereits amplifizierten DNA-Abschnitt binden. Diese Methode dient der Erhöhung der Amplifikationsspezifität und wurde für Ansätze verwendet, die bei anderen Spezies eingesetzt werden sollten.
Für die Reamplifikation wurden jeweils 0,5 - 1 µl der ersten PCR verwendet.

2.2.2.5 Vectorette-PCR

Die Methode der Vectorette-PCR dient der Amplifikation unbekannter DNA-Sequenzen. Einzige Voraussetzung hierfür ist ein spezifischer Primer, der in einem bekannten flankierenden Abschnitt bindet.
Zunächst wird eine Vectorette-Library hergestellt. Dazu wird genomische DNA mit einer Restriktionsendonuclease verdaut. An die entstandenen Enden werden sogenannte Vectorette-Einheiten ligiert. Dies sind doppelsträngige DNA-Stücke, deren mittlerer Abschnitt aus nicht-komplementären Sequenzen besteht, und demnach ungepaart vorliegt. Die Vectorette-Library wird als Template für die Vectorette-PCR eingesetzt. Zur Amplifikation (STEP 1) wird der spezifische Primer (s. o.), sowie der Universal-Vectorette-Primer verwendet. Dieser besitzt dieselbe Sequenz wie ein Strang des ungepaarten Abschnitts der Vectorette-Einheit. Daher kann dieser Primer erst binden, wenn in einem vorherigen PCR-Zyklus durch Verlängerung des spezifischen Primers auf einem oder mehreren Library-Fragmenten, die dem Universal-Vectorette-Primer komplementäre Sequenz synthetisiert worden ist. Daher können theoretisch nur Fragmente amplifiziert werden, auf denen der spezifische Primer bindet. Außerdem besteht die

Möglichkeit, die Spezifität der Amplifikation durch einen Nested-PCR-Ansatz zu erhöhen (STEP 2).

Für die Durchführung der Vectorette-PCR wurde der Vectorette II Starter Pack Kit von SIGMA-GENOSYS verwendet. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Ansätze für Vectorette-PCR:

STEP 1:	1	µl	Vectorette Library
	1,5	mM	$MgCl_2$-Mix
	50	mM	dNTP Mix (mM)
	250	nM	Universal Vectorette Primer
	250	nM	Spezifischer Primer (10 µM)
	0,05	U / µl	*Taq*-Polymerase (5 U / µl)*
STEP 2:	0,1	µl	PCR-Produkt aus STEP 1
	1,5	mM	$MgCl_2$-Mix
	50	mM	dNTP Mix (20 mM)
	1	µM	Nested Vectorette Primer
	1	µM	Spezifischer Nested Primer (10 µM)
	0,05	U / µl	*Taq*-Polymerase (5 U / µl)*

* *Taq*-Polymerase wird erst nach 3’ / 94 °C zugegeben.

PCR-Programm für Vectorette-PCR (STEP 1 und STEP 2):

40 Zyklen:	94 °C	1’
	54 °C	1’
	72 °C	3’

2.2.2.6 Klonierung von PCR-Produkten

2.2.2.6.1 TOPO TA Klonierung

Die TOPO TA Klonierung bietet die Möglichkeit, PCR-Produkte ohne weitere Vorbehandlung und mit hoher Effizienz zu klonieren. Der verwendete lineare Vektor besitzt überhängende Thymidinreste an den 3'-Enden, die zu den durch die Taq-Polymerase angehängten Adenosinresten der PCR-Produkte komplementär sind. Außerdem liegt an den Vektorenden kovalent gebundene Topoisomerase I vor, die Ligaseaktivität aufweist (Shuman 1994). Zur TOPO TA Klonierung wurde der TOPO TA Cloning Kit (INVITROGEN) verwendet. Die Ausführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.2.6.2 Klonierung über Schnittstellen in der Primersequenz

Verwendet man PCR-Primer, die Erkennungssequenzen für eine Restriktionsendonuklease enthalten, so können durch Verdau des PCR-Produktes mit dem entsprechenden Enzym 'Sticky Ends' für die Ligation in einen geeigneten Vektor erzeugt werden. Es wurden Primer verwendet, die am 5'-Ende die Erkennungssequenz für *Eco*RI (5'-GAG CTC **GAA TTC** N_n-3') besaßen.

Das zu klonierenden Fragment wurde zunächst in einem 12-fachen PCR-Ansatz amplifiziert, mit 2 Volumina Ethanol (-20 °C) gefällt und dann in einem geeigneten Volumen TE 10/1 gelöst. Nach Kontrolle über ein 2%-iges Agarosegel wurde der gesamte Ansatz für 6 h mit 1 - 5 U / µg DNA *Eco*RI bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit Phenol und Chloroform / Isoamylalkohol (4%) extrahiert. Dann wurde die DNA erneut mit 2 Volumina Ethanol 100% (-20 °C) gefällt und in TE 10/1 aufgenommen.

Zur Ligation wurden ca. 100 ng des Vektors pBlueskript II SK (+/-) (STRATAGENE) mit *Eco*RI linearisierten in einem molaren Verhältnis von 3 : 1 mit der Insert-DNA gemischt und mit 1000 U T4 DNA-Ligase (NEB) über Nacht bei 15 °C inkubiert.

Die Transformation mittels Elektroporation erfolgte in einem Electro Cell Manipulator 600 (AGS) bei einer Feldstärke von 12,25 kV / cm. Es wurde 1 µl des 1:50 verdünnten Ligationsansatzes eingesetzt. Die Herstellung der elektrokompetenten Bakterien und die Elektroporation wurden entsprechend den Angaben des Geräteherstellers durchgeführt.

2.2.2.6.3 Screening der gewonnenen Klone

Die verwendeten Vektoren pBlueskript II SK(+/-) und pCR2.1-TOPO sind Träger eines Amplicillin-Resistenz-Gens und bieten zusätzlich die Möglichkeit Klone, die ein Plasmid mit Insert tragen, durch Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal-haltigen Agarplatten zu identifizieren.

Um zu verifizieren, daß die erhaltenen Klone die richtigen Inserts enthalten, wurden verschiedene Screening-Methoden verwendet:

- PCR mit M13-Primern auf Koloniematerial

Zu untersuchende Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Originalplatte sowohl auf eine Rasterplatte, als auch in einen PCR-Ansatz übertragen. Nach Elektrophorese der PCR-Produkte lassen sich die richtigen Inserts an der Größe, oder nach Southern Blot und nachfolgender Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde, erkennen.

- Plasmid-Minipräp und Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym

Nach Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen, die auf beiden Seiten des Inserts schneiden, kann die Insertgröße durch elektrophoretische Auftrennung der Spaltprodukte anhand der Größe, oder nach Southern Blot und nachfolgender Hybridisierung mit einer geeigneten Sonde, verifiziert werden.

- Koloniehybridisierung

Die Anfertigung von Replica-Filtern für die Koloniehybridisierung erfolgte nach Sambrook et al. 1989. Für die Hybridisierung wurden klonierte DNA-Sonden verwendet, die entweder radioaktiv, oder mit alkalischer Phosphatase markiert wurden (s. u.). Die Hybridisierungsbedingungen wurden entsprechend der verwendeten Sondenmarkierung gewählt.

2.2.3 Analyse von PCR-Produkten

2.2.3.1 Microsatelliten-Analyse

Die Microsatelliten-Analyse wird zur Bestimmung der relativen oder absoluten Fragmentgrößen polymorpher Marker bei unterschiedlichen Individuen eingesetzt und liefert so die Rohdaten für Segregationsanalysen. Ermittelte Allelgrößen wurden gemeinsam mit den Stammbaumdaten zur Auswertung in das Programm 'Cyrillic' (Cherwell Scientific Publishing) eingegeben.

2.2.3.1.1 Fragment-Analyse am ALFexpress

Sofern Cy5-markierte Primer zur Verfügung standen, wurde die Microsatelliten-Analyse auf einem ALFexpress Sequencer durchgeführt. Zur Amplifikation der zu untersuchenden Sequenzen wurde jeweils ein markierter und ein unmarkierter Primer verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfogte über ein Long Ranger Gel (FMC) bei 1500 V, 38 mA, 34 W und 55 °C in 0,5 x TBE. Zur Auswertung wurde die Fragment-Manager Software (AP BIOTECH) verwendet. Mitgeführte interne und externe Längenstandards ermöglichen einerseits eine Eliminierung von Fehlern durch unterschiedliches Laufverhalten in den einzelnen Spuren, andererseits aber bei Bedarf auch eine genaue Größenbestimmung der PCR-Produkte.

2.2.3.1.2 Analyse von (CA)-Repeats nach radioaktiver Hybridisierung

Nach der Amplifikation wurden 2 - 5 µl des PCR-Produktes über ein denaturierendes 6%-iges Acrylamidgel in 1 x TBE bei ca. 36 V / cm aufgetrennt. Dabei wurde die Dauer der Elektrophorese in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Fragmente zwischen 3,5 und 4 h variiert.
Nach der Elektrophorese wurden die PCR-Produkte auf eine Hybond N+Membran geblottet und mit einem radioaktiv markierten $(CA)_{11}$-Oligonukleotid nachgewiesen.

2.2.3.2 EMD (Enzymatic Mutation Detection)

Der EMD-Test kann sowohl zur Detektion von Mutationen als auch von Polymorphismen verwendet werden. Die zu untersuchenden Sequenzabschnitte werden zunächst mit zwei Cy5-markierten Primern amplifiziert, dann denaturiert und anschließend hybridisiert. Bei der Hybridisierung von Fragmenten unter-

schiedlicher Allele treten stellenweise ungepaarte Basen auf. Die für den EMD-Test verwendete T4 Endonuclease VII erkennt solche Stellen und schneidet innerhalb von 6 bp 3' dieser Position. Die entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

Es wurde der PASSPORT Mutation Scanning Kit (AP BIOTECH) mit einem modifizierten Protokoll verwendet. Der EMD-Ansatz wurde gegenüber den Herstellerangaben halbiert. Die PCR für die zu untersuchenden Fragmente wurde so optimiert, daß eine Konzentration von mindestens 10 ng / µl erreicht wurde.

Zum Nachweis von interindividuellen Sequenzunterschieden bei Markern, die in einzelnen Proben homo- oder hemizygot vorlagen, wurden die PCR-Produkte von zwei Individuen 1:1 gemischt und dann entsprechend dem Standardprotokoll analysiert.

Denaturierung und Hybridisierung erfolgten in einer PCR-Maschine (Corbett FTS 960) mit folgendem Programm:

Denaturierung:	98 °C	6 min.
Hyridisierung:	85 °C	10 s
	75 °C	5 min.
	65 °C	5 min.
	55 °C	5 min.
	45 °C	5 min.
	35 °C	1 min.
	25 °C	5 min.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf einem ALFexpress Sequencer über ein Long Ranger-Gel bei 800 V, 60 mA, 34 W und 60 °C. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Bei der Elektrophorese wurde jeweils in 2 - 3 Spuren pro Gel ein externer Längenstandard mitgeführt. Dieser ermöglicht bei der Auswertung eine rechnerische Eliminierung von Fehlern durch unterschiedliches Laufverhalten der Proben in den einzelnen Spuren. Außerdem kann durch eine Größenbestimmung die Position von detektierten Sequenzvarianten abgeschätzt werden. Die Auswertung erfolgte über die Fragment Analyzer Software (AP BIOTECH).

2.2.3.3 Sequenzierungen

Zum Sequenzieren wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt: T7 Sequenzierung (mit modifizierter T7 Polymerase) und Cycle Sequencing. Beide Verfahren erfolgen nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977).

2.2.3.4 Sequenzierung von Plasmiden

Zur Sequenzierung von Plasmiden wurde der T7-Autoread-Kit (AP BIOTECH) in Kombination mit Cy5-markierten Primern, entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Für jede Reaktion wurden ca. 5 µg Plasmid eingesetzt.

2.2.3.5 Cycle-Sequencing von PCR-Produkten

Zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten wurde die Methode des Cycle-Sequencing eingesetzt, da hierfür aufgrund des zyklischen Ablaufs eine geringere Template-Menge ausreicht.
Für die Sequenzierreaktion wurde der Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (AP BIOTECH) unter Berücksichtigung der Herstellerangaben verwendet.
PCR-Produkte wurden in einem präparativen Ansatz mit unmarkierten Primern amplifiziert. Nach Abtrennung der überschüssigen Primer über eine Microspin S-400 HR-Säule (AP BIOTECH) wurden pro Sequenzreaktion 1 - 5 µl PCR-Produkt eingesetzt. Die Cy5-markierten Sequenzier-Primer besaßen dieselbe Sequenz wie die zur Amplifikation verwendeten PCR-Primer.
Die Sequenzierung erfolgte in einer PCR-Maschine mit folgendem Programm:

Cycle-Sequencing Programm (25 Zyklen):	96 °C	30 s
	60 °C	10 s
	72 °C	20 s

2.2.3.6 Elektrophorese im ALFexpress

Für alle Sequenzierungen wurden dieselben Elektrophoresebedingungen verwendet. Die Elektrophorese erfolgte auf einem ALFexpress Sequencer bei 1500 V, 38 mA, 34 W und 55 °C für 720 min. Die Dauer der Elektrophorese wurde entsprechend der Größe der zu sequenzierenden Fragmente variiert. Zur Auftrennung wurde ein Long Ranger Gel und 0,5 x TBE als Laufpuffer verwendet.

2.2.3.7 Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzdaten wurden zur weiteren Analyse mit der Software GCG (Devereux et al. 1984) bearbeitet. Sequenzvergleiche wurden außerdem auch online bei NCBI (http://ncbi.nlm.nih.gov) durchgeführt.

2.2.4 Herstellung von Southern Blots für quantitative Auswertung

Je 10 µg genomische DNA von Patienten und gesunden Kontrollpersonen wurde mit 1 - 5 U / µg DNA *Eco*RI oder *Hin*dIII 6 - 8 h bei 37 °C inkubiert und über Nacht (ca. 15 h) bei 2 V / cm in einem 0,8%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde anschließend zur Depurinierung für 30 min. mit 0,25 M Salzsäure behandelt und dann über alkalischen Transfer (nach Sambrook et al. 1989) auf eine Hybond N+ Membran (AP BIOTECH) übertragen.

2.2.5 Hybridisierungsmethoden

2.2.5.1 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

2.2.5.1.1 Markierung der Sonde

Die Sondenmarkierung erfolgte mit dem T7-Quick-Prime Kit (AP Biotech). Die verwendete Methode basiert auf der Oligo-Markierung nach Feinberg und Vogelstein (1983). Für die Markierung wurden je 50 - 100 ng Sonde eingesetzt.

Markierungsansatz:

Sonde	50 - 100	ng	
Mix (Nucleotide und Zufallsnonamere)	10	µl	
[α-^{32}P]dCTP	3	µl	(37x10^4 Bq/µl; 3000Ci/mMol)
T7-DNA-Polymerase	1	µl	(11,5 U)
TE 10/1	ad 50	µl	

Der Markierungsansatz wurde für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 Volumen Phenol gestoppt. Die freien Nucleotide wurden über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Die Sonde wurde direkt vor Gebrauch 10 min. bei 95 °C denaturiert.

2.2.5.1.2 Hybridisierung

Die Hybridisierungen wurden bei 60 - 62 °C, entweder in Plexiglasröhren in einem Rotationsofen, oder in verschließbaren Kunststoffwannen im Schüttelwasserbad durchgeführt. In Abhängigkeit von der Größe der verwendeten Röhre oder Wanne erfolgte die Hybridisierung in 20 - 200 ml Hybridisierungslösung. Vor Zugabe der markierten Sonde wurde der Filter mindestens 2 h in dieser Hybridisierungslösung prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Hybridisierungen erfolgten stets über Nacht (15 - 24 h). Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Membran zum Entfernen unspezifisch gebundener Sondenmoleküle mit Waschpuffern absteigender Salzkonzentration (2xSSC, 0,2xSSC, 0,1xSSC mit je 0,1% SDS) bei 60 °C gewaschen. Die Dauer der einzelnen Waschschritte wurde dabei entsprechend der vorhandenen Signalstärke variiert.

2.2.5.2 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotidsonden

2.2.5.2.1 Markierung der Sonde

Zur Markierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurde die T4-Polynukleotidkinase unter Zusatz von [γ^{32}P]-ATP verwendet. Dieses Enzym katalysiert den Austausch von 5'-Phosphatresten. Synthetische Oligonukleotide besitzen kein 5'-Phosphat, daher erfolgt nur die Übertragung des radioaktiven γ-Phosphats des ATP auf das 5'-OH des Oligonukleotids. Für die Markierung wurden je 50 - 100 pMol Sonde eingesetzt.

Markierungsansatz:

Sonde	50 - 100	pMol	
10 x One-Phor-All Puffer	2	µl	
[γ–^{32}P]ATP	7	µl	($37x10^4$ Bq/µl; 5000 Ci / mMol)
T4 Polynucleotidkinase	1	µl	(9,7 U)
Aqua bidest.	ad 20	µl	

Der Markierungsansatz wurde für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen für 10 min. auf 65 - 95 °C inaktiviert. Zum Abtrennen der Nukleotide wurde der Ansatz auf eine DEAE Sephacel-Säule aufgetragen und

mit 2 ml TE 10/1 und 2 ml 0,2 M NaCl (in TE 10/1) gewaschen. Die Sonde wurde dann mit 0,5 M NaCl (in TE 10/1) eluiert.

2.2.5.2.2 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte in Plexiglasröhren in einem Rotationsofen bei 45 °C über Nacht (15 - 24 h). Die eingesetzte Menge an Hybridisierungslösung variierte in Abhängigkeit von der Membrangröße zwischen 20 und 40 ml. Vor Zugabe der markierten Sonde wurde der Filter bei 60 °C für mindestens 2 h prähybridisiert.
Zum Entfernen der unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle wurde der hybridisierte Filter in 6xSSC gewaschen. Die Anzahl und Dauer der Waschschritte wurde in Abhängigkeit von der Signalstärke variiert. Die Waschtemperatur wurde bei Bedarf von Raumtemperatur auf bis zu 37 °C erhöht.

2.2.5.2.3 Nicht-radioaktive Hybridisierung mit DNA-Sonden

Zum nicht-radioaktiven Nachweis von DNA-Sequenzen wurde der AlkPhos direct-Kit (AP BIOTECH) in Verbindung mit CDP-Star chemoluminescent detection reagent (AP BIOTECH) verwendet. Der Einsatz erfolgte gemäß den Herstellerangaben.
Bei der Markierung wird eine thermostabile alkalische Phosphatase kovalent an die Sondenmoleküle gebunden. Der Nachweis der hybridisierten Sonde erfolgt über Chemolumineszenz mittels Umsetzung eines Dioxetan-Substratmoleküls durch die alkalische Phosphatase.

2.2.5.2.4 Markierung der Sonde

Die benötigte Sondenmenge ist abhängig von der Menge an eingesetzter Hybridisierungslösung. Pro ml Hybridisierungslösung müssen 5 - 10 ng Sonde verwendet werden.

2.2.5.2.5 Hybridisierung

Die Hybridisierungen erfolgten in verschließbaren Kunststoffwannen im Schüttelwasserbad. Vor der Sondenzugabe wurde die Membran für mindestens 15 min. bei 55 °C - 60 °C in der Hybridisierungslösung prähybridisiert (s. o.). Die Menge an benötigter Hybridisierungslösung ist von der Größe der zu hybridisierenden Membran abhängig. Es wurden ca. 0,2 ml Hybridisierungslösung pro cm^2

Membran eingesetzt. Die Dauer der Hybridisierung betrug 15 - 24 h. Waschen des Filters und Detektionsreaktion erfolgten nach Angaben des Herstellers.

2.2.5.3 Auswertung von hybridisierten Southern Blots

Die Auswertung der Hybridisierungssignale erfolgte über Autoradiographie auf Fuji RX Röntgenfilme (FUJI). Zur Exposition wurden Cassetten mit Verstärkerfolie (Cronex, DUPONT) (Laskey und Mills 1977) verwendet, die in Abhängigkeit von der Signalstärke für unterschiedliche Zeit bei Raumtemperatur oder bei -70 °C inkubiert wurden.

Die quantitative Auswertung von Hybridisierungssignalen (s. u.), erfolgte mittels Phosphor Imager. Da die benötigte Expositionszeit für eine Auswertung im Phosphor Imager gegenüber der Autoradiographie deutlich verkürzt ist, wurden auch Filter, die schwache Signale aufwiesen im Phosphor Imager ausgewertet, um schneller zu einem Ergebnis zu gelangen.

2.2.5.4 Quantitative Auswertung von genomischen Southern Blots

Die quantitative Auswertung von Southern Blots dient der Bestimmung der Kopienzahl von Genen, oder anderen Sequenzabschnitten auf genomischer Ebene. Hierzu wurde ein Filter mit einer Sonde aus dem zu untersuchenden Gen, und zusätzlich mit einer Referenzsonde, deren Kopienzahl bekannt ist, entweder nacheinander, oder in einem gemeinsamen Ansatz hybridisiert. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte über einen Phosphor Imager (MOLECULAR DYNAMICS). Die hierbei ermittelten Signalintensitäten wurden über das Programm ‘Filter’ (©G. Vogel; Geerkens et al. 1995) analysiert. Dieses Programm berechnet aus den eingegebenen Rohdaten relative Signalintensitäten, bei denen ein Wert von ca. 50% einer Kopie des untersuchten Gens entspricht, ca. 100% entsprechen zwei Kopien. Dazu wird zunächst für jeden Patienten, bzw. jede Kontrollperson das Verhältnis der Signalintensitäten von spezifischer Probe zu Referenzprobe berechnet. Dieser Wert wird dann durch die vermutete, oder bekannte Anzahl der vorhandenen Genkopien dividiert. Der daraus für alle Spuren eines Filters errechnete Mittelwert wird auf 50 % normiert. Die Einzelergebnisse werden dann mit demselben Faktor korrigiert. So können einerseits systematische Fehler eliminiert und andererseits die Ergebnisse unterschiedlicher Filter besser verglichen werden.

2.2.6 Isolation von Klonen aus einer genomischen ZAP Express Bibliothek von *Ellobius lutescens*

Der ZAP Express Vektor (STRATAGENE) ist ein modifizierter Lambda Vektor, der Inserts einer Länge von 0 bis 12 kbp aufnehmen kann. Ein entscheidender Vorteil dieses Vektors ist die Möglichkeit, klonierte Inserts durch Koinfektion mit einem sogenannten Helfer-Phagen auszuschneiden. Diese liegen dann nach der Rezirkularisation in Form eines pBK-CMV Phagemid Vektors vor, der wesentlich einfacher handzuhaben ist als die ursprünglichen Bakteriophagen.
Für die Vermehrung der ZAP Express Bibliothek, bzw. isolierter Einzelklone wurde der Bakterienstamm XL1-Blue MRF' (STRATAGENE) eingesetzt.
Die verwendete Bibliothek enthielt Fragmente genomische DNA eines männlichen *Ellobius lutescens*, die in die *Bam*HI-Schnittstelle der Multiple Cloning Site einkloniert war.

2.2.6.1 Titerbestimmung

Um die Bakteriophagen in der gewünschten Dichte ausplattieren zu können, ist es entscheidend, den Titer der verwendeten Phagen-Suspension genau zu kennen. Daher wurde der Titer der Gesamtbibliothek in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Auch bei neu isolierten Phagen-Klonen wurde zunächst immer der Titer bestimmt.
Hierzu wurde die Phagen-Suspension in Schritten von 1 : 10 in SM-Puffer verdünnt. Die Verdünnungen, die ungefähr dem erwarteten Titer entsprachen, wurden mit je 100 µl einer Übernacht-Kultur XL1 Blue MRF' (in NZYDT-Medium + 0,2% Maltose + 10 mM $MgSO_4$) und 4 ml Top-Agar (50 °C) versetzt und auf NZYDT-Agarplatten (∅ 94 mm) ausplattiert. Die Platten wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach dem Auszählen der Plaques wurde der Titer in der Einheit pfu / ml berechnet.

2.2.6.2 Plattieren der Bibliothek zur Anfertigung von Replikafiltern

Um Sequenzabschnitte bestimmter Gene aus der Bibliothek isolieren zu können, müssen die entsprechenden rekombinanten Klone zunächst über eine Hybridisierung identifiziert werden. Dazu muß die Library mit einer geeigneten Plaque-Anzahl und Plaque-Dichte ausplattiert werden. Die Anzahl der eingesetzten

Phagen sollte so gewählt werden, daß theoretisch alle unterschiedlichen in der Library enthaltenen Klone auch auf den angefertigten Platten repräsentiert sind. Die Plaque-Dichte dart nicht zu hoch sein, da sonst keine Einzel-Plaques mehr zu unterscheiden sind.

Im vorliegenden Fall wurde abgeschätzt, daß die gesamte Bibliothek ca. zwei Genomäquivalente, also ungefähr 4×10^9 bp enthält. Bei einer durchschnittlichen Insertgröße von etwa 15×10^3 bp entspricht das $2{,}6 \times 10^5$ Klonen. Diese wurden mit einer Dichte von $1{,}5 \times 10^4$ Plaques pro Platte ausplattiert.

Zum Ausplattieren wurde für jede Platte die entsprechende Menge Phagen-Suspension mit 100 µl einer Über-Nacht-Kultur XL1 Blue MRF' (s. Titrierung) und 8 ml Top-Agar (50 °C) gemischt und auf NZYDT-Platten (∅ 145 mm) ausgegossen. Die Platten wurden dann über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.6.3 Herstellung von Replikafiltern (nach Sambrook et al. 1989)

Zur Herstellung der Replikafilter wurden Hybond N+ Membranen (∅ 132 mm) (AP BIOTECH) verwendet. Vor dem Auflegen der Filter wurden die Platten für ca. 10 min. bei -20 °C gekühlt, um ein Ablösen der Top-Agar Schicht beim Abziehen der Filter zu verhindern. Die Membranen wurden 5 min. auf den Platten belassen. Während dieser Zeit wurden sowohl an den Platten als auch an den Membranen Markierungen angebracht, die die Ausrichtung der Membranen eindeutig festlegten. Die anschließende Fixierung der Phagen-DNA auf den Filtern erfolgte nach Sambrook et al. 1989.

2.2.6.4 Hybridisierung der Replikafilter

Für die Hybridisierung der Replikafilter wurden radioaktiv markierte Sonden verwendet (s. o.). Für je 5 Filter (∅ 132 mm) wurde ein Markierungsansatz auf 50 ml Hybridisierungslösung eingesetzt.

2.2.6.5 Isolation von 'Plaque-Pools' und PCR-Screening

Aufgrund der hohen Plaque-Dichte auf den Original-Platten war es in den meisten Fällen nicht möglich, den Hybridisierungssignalen auf den Röntgenfilmen eindeutige Einzel-Plaques zuzuordnen, bzw. Einzel-Plaques auszustechen. Daher wurden Bereiche mit einem Durchmesser von ca. 0,5 cm entnommen und in 50 µl SM-Puffer übertragen. Die daraus gewonnene Phagen-Suspension wurde über

PCR auf die gesuchten Sequenzen hin gestest. Dazu wurde 1 µl der Suspension pro PCR-Reaktion verwendet.

2.2.6.6 Screening auf Einzel-Plaques

Von PCR-positiven 'Pools' wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und für eine zweites Screening ausplattiert. Dabei wurden nur Platten für die Herstellung von Replikafiltern für eine erneute Hybridisierung verwendet, auf denen Einzel-Plaques erkennbar waren. Plaques, die positive Hybridisierungssignale lieferten, wurden isoliert und nochmals über PCR getestet.

2.2.6.7 *IN VIVO* Excision aus dem ZAP Express Vektor und Rezirkularisierung des pBK-CMV Phagemid Vektors

Durch Koinfektion mit sogenannten Helfer-Phagen werden in den Bakterienzellen Proteine gebildet, die auf der Sequenz des ZAP Express Vektors Initiations- und Terminationssignale für die DNA-Synthese erkennen und die dazwischenliegenden Sequenzen duplizieren. Diese Signale flankieren die Sequenzen des auszuschneidenden Phagemids, in dem das Insert enthalten ist. Der synthetisierte DNA-Abschnitt wird zirkularisiert und in Phagemid-Partikel verpackt. Zur Amplifikation dieser Phagemid-Partikel wird ein nicht-suprimierender *E.coli*-Stamm, wie z. B. XLOLR verwendet, um Replikation des Helfer-Phagen zu verhindern.
Die Inserts isolierter Klone wurden zur weiteren Untersuchung als Phagemids aus dem ZAP Express Vektor ausgeschnitten. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.7 Fluorezenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)

2.2.7.1 Chromosomenpräparation aus kultivierten Fibroblasten

Der Fibroblastenkultur wurde 60 min. vor Abbruch der Kultur Colcemid zugegeben. Die Zellen wurden abtrypsiniert, in 0,4% KCl (37 °C) aufgenommen und 30 min. bei 37 °C inkubiert (hypotone Behandlung). Die Zellen wurden dann bei 1000 rpm abzentrifugiert. Die Fixierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von eiskalter Fixierlösung (Methanol : Eisessig = 3 : 1) und anschließender Inkubation für 15 min. bei 4 °C. Dieser Schritt wurde 4 bis 5 Mal wiederholt. Anschließend

wurden die Zellen in Fixierlösung resuspendiert und auf Objektträger aufgetropft. Die Chromosomenpräparate wurden dann luftgetrocknet und in einer aufsteigenden Ethanolreihe von Essigsäure und Wasser befreit. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.2.7.2 Markierung von DNA-Sonden für FISH durch Nick-Translation

(nach Rigby et al. 1977)

Die für die FISH verwendeten Sonden wurden durch Nick-Translation markiert. Für jeden Markierungsansatz wurden 1 - 2 µg Sonden-DNA eingesetzt.

Markierungsansatz:	10	µl	10 x Puffer für Nick-Translation
	10	µl	2-Mercaptoethanol (0,1 M)
	10	µl	dNTP-Mix (0,5 mM)
	4	µl	Biotin-dUTP
	1 - 2	µg	Sonden-DNA
	2	µl	DNA-Polymerase I
	nach Bedarf		DNase I
	ad 100µl		Aqua bidest.

Der Ansatz wurde für 90 min. bei 15 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Enzyme wurde dann 1 ml 0,5 M EDTA zugegeben und zusätzlich 10 min. auf 65 °C erhitzt. Die Kontrolle der Fragmentgröße erfolgte mittels Gelelektrophorese.

2.2.7.3 Hybridisierung der markierten Sonde

2.2.7.3.1 Sondenvorbereitung

Für die Hybridisierung wurden 0,5 - 1 µg der markierten Sonde verwendet. Diese wurden mit 20 µg Heringssperma-DNA, ca. 5 µg fragmentierter *Ellobius lutescens*-DNA zur Absättigung repetitiver Sequenzabschnitte, 1/10 Volumina 3 M Na-Acetat und 2 Volumina 100% Ethanol (-20 °C) über Nacht bei -20 °C gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert, mit 70% Ethanol (-20 °C) gewaschen, bei 37 °C getrocknet und dann in 5 µl 100% Formamid (pH 7,0) gelöst. Nach Zugabe von 5 µl 20% Dextransulfat / 4xSSC (pH 7,0) wurde die Sonde bei 75 °C denaturiert.

2.2.7.3.2 Vorbehandlung und Hybridisierung der Chromosomenpräparate

Um die Zugänglichkeit der chromosomalen DNA zu verbessern und eine unspezifische Bindung der Sonde an Proteine oder RNA zu reduzieren, wurden die Präparate mit RNase A und Pepsin behandelt. Dazu wurden die Objektträger zunächst für 1 h mit RNase A (100 µg / ml in 2xSSC) und nach Waschen mit 2xSSC für 7 min. mit Pepsin (0,5 µg / ml in 0,01 M HCl, pH 2,3) bei 37 °C inkubiert. Die Präparate wurden dann in 1xPBS / 50 mM $MgCl_2$ gewaschen und anschließend in 1% Formaldehyd (in 1xPBS / 50 mM $MgCl_2$) fixiert. Nach Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe wurden die Präparate luftgetrocknet.
Auf jeden Objektträger wurden 10 µl Hybridisierungsmix (s. Sondenvorbereitung) aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37 °C.
Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Präparate 3 x 10 min. in 50% Formamid in 1xSSC (45 °C), 3 x 5 min. in 2xSSC (45 °C) und 2 x in 0,1xSSC (60 °C) gewaschen.
Um eine unspezifische Bindung der zum Sondennachweis eingesetzten Antikörper zu verhindern, wurden die Chromosomenpräparate 30 min. lang in 5% BSA / 4xSSC / 0,1% Tween 20 inkubiert und dann in 4xSSC / 0,1% Tween 20 aufbewahrt.

2.2.7.3.3 Nachweis der Sonde

Zunächst wurde die Präparate für 30 min. bei 37 °C mit FITC-Avidin (10 µg / ml in 1% BSA / 4xSSC / 0,1% Tween 20) inkubiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Inkubationsschritte, einmal für 30 min. mit 5 µg / ml Anti-Avidin und einmal 30 min. erneut mit 10 µg / ml FITC-Avidin, jeweils in 1% BSA / 4xSSC / 0,1% Tween 20, bei 37 °C. Diese Schritte dienen der Signalverstärkung nach der sogenannten ‘Sandwich-Technik’ (Pinkel et al. 1986). Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden die Präparate nach jeder Inkubation in 4xSSC / 0,1% Tween 20 (45 °C) gespült.
Anschließend wurden die Chromosomen in DAPI (1 µg / ml) / Propidiumjodid-Lösung (40 ng / µl) gegengefärbt, in Aqua bidest. gespült und luftgetrocknet.
Die Auswertung erfolgte an einem Axiophot-Mikroskop (ZEISS) und dem Bildanalyse-System ISIS 3 V.2.44 (METASYSTEMS).

3 ERGEBNISSE

Untersuchungen an Organismen, die Abweichungen von der bei Säugetieren üblichen Gonosomenkonstitution XX/XY zeigen, können neue Erkenntnisse über Gene und Mechanismen der Geschlechtsdeterminierung liefern. In der vorliegenden Arbeit wurden geschlechtsdeterminierende Gene und Mechanismen bei familiär auftretendem Swyer-Syndrom und bei *Ellobius lutescens* untersucht.

3.1 Untersuchungen geschlechtsdeterminierender Gene und Mechanismen bei Patienten mit Swyer-Syndrom

Die für die Untersuchungen verwendete DNA der Patientinnen AC und LC und die DNA der Eltern ALC und LIC wurde aus EDTA-Blut isoliert. DNA der Patientin VC wurde aus histologischen Präparaten gewonnen.

3.1.1 Sequenzierung des *SRY*-Gens

Mutationen in der kodierenden Region des *SRY*-Gens stellen die häufigste bekannte Ursache für XY-Geschlechtsumkehr dar. Um auszuschließen, daß auch bei den drei Schwestern VC, AC und LC das Swyer-Syndrom durch eine Mutation in *SRY* verursacht wird, wurde der ORF des *SRY*-Gens bei der Patientin AC sequenziert. Ein 859 bp umfassendes, die kodierende Region des *SRY*-Gens einschließendes Fragment, wurde mit den flankierenden Primern SRYA-f und SRYA-r amplifiziert. Die Sequenzierung erfolgte in beiden Richtungen durch Cycle-Sequencing mit den Primern SRYi-f und SRYi-r. Dabei wurde die kodierende Region von Position 2034 bis 2632 erfaßt. Ein FASTA Vergleich mit der publizierten Sequenz des humanen *SRY* (GenBank Acc. Nr. L10102) zeigte, daß in dem untersuchten Abschnitt keine Mutationen vorliegen.

3.1.2 Bestimmung der Anzahl der Kopien des *DAX1*-Gens

Duplikationen der in Xp21.3 lokalisierten DSS-Region können eine XY-Geschlechtsumkehr verursachen. Hierfür ist eine doppelte Dosis des *DAX1*-Gens verantwortlich, das innerhalb dieses Intervalls liegt.

Die Bestimmung der Anzahl der *DAX1*-Kopien mittels quantitativ ausgewerteter Southern Blots wurde bei Patientin AC durchgeführt. Es wurden zwei Southern

Blots angefertigt, wobei die DNA von gesunden Kontrollpersonen, bzw. von AC und LIC (Mutter) einmal mit *Hin*dIII (Filter 1) und einmal mit *Eco*RI (Filter 2) verdaut wurde. Die Intensitäten der Hybridisierungssignale der *DAX1*-spezifischen Sonde 1Aa und der Referenzsonde pC63 wurden im Phosphor Imager gemessen und über das Programm 'Filter' in Relation gesetzt. Bei den so ermittelten relativen Signalintensitäten entsprechen 50% einer Kopie des Gens, 100% entsprechen zwei Kopien des Gens. **Tabelle 1** zeigt die für die beiden Filter ermittelten Einzeldaten, sowie die daraus berechneten Mittelwerte und die abgeleitete Anzahl an *DAX1*-Kopien.

Die bei den mitgeführten gesunden Kontrollpersonen erhaltenen Mittelwerte bestätigen eine gute Annäherung an die erwarteten Werte von etwa 50% bei Männern und 100% bei Frauen. Die bei der Patientin AC vorliegende relative Signalintensität von 54,7% entspricht somit einer *DAX1*-Kopie. Bei LIC (Mutter) wurde ein Wert von 107,2% berechnet, der zwei Kopien des Gens entspricht.

TABELLE 1: Relative Signalintensitäten und Anzahl der *DAX1*-Kopien

Aus den durch das 'Filter-Programm' ermittelten relativen Signalintensitäten beider Filter wurde für Patienten und Kontrollen jeweils die Mittelwerte berechnet. Aus diesen wurde die vorliegende Anzahl der *DAX1*-Kopien abgeleitet.

Patient / Kontrolle	Relative Signalintensitäten (%)			*DAX1*-Kopien
	Filter 1	Filter 2	Mittelwert	
Kontrolle ♀	95,3	82,7	89,0	2
Kontrolle ♀	78,6	94,5	86,6	2
Kontrolle ♂	58,1	46,0	52,1	1
Kontrolle ♂	50,3	51,0	50,7	1
Kontrolle ♂	48,8	48,2	48,5	1
Kontrolle ♂	50,4	60,3	55,4	1
AC	56,1	53,2	54,7	1
LIC (Mutter)	112,6	101,8	107,2	2

3.1.3 Segregationsanalyse mit X-chromosomalen Markern

Für einige familiäre Fälle des Swyer-Syndroms wird ein X-chromosomaler Erbgang diskutiert, ohne daß jedoch bisher ein Kandidatengen ermittelt werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Vererbung des Swyer-Syndroms auch bei der vorliegenden Familie mit einer X-chromosomalen Vererbung kompatibel ist, wurde eine Segregationsanalyse mit 27 X-chromosomalen, polymorphen PCR-Markern durchgeführt. Es wurden Marker im Abstand von 0,3 bis ca. 20 Mbp verwendet. Die höhere Markerdichte wurde zur Eingrenzung identifizierter Crossover verwendet (**Abbildung 1**).

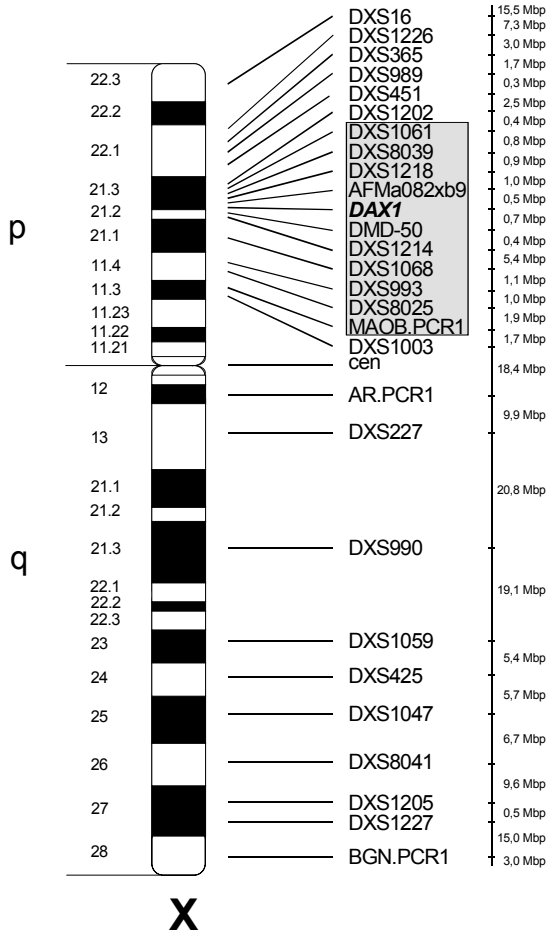


ABBILDUNG 1: Anordnung der analysierten X-chromosomalen Marker.

Abstände und Anordnung der Marker wurden der Integrated X Chromosome Database ('integrated 3') entnommen (http://ixdb.molgen.mpg.de).
In dem grau unterlegten Abschnitt besitzen alle drei Schwestern denselben Haplotyp.

Zur Darstellung der Haplotypen wurden der Stammbaum und die ermittelten Allele in das Programm ‘Cyrillic’ eingegeben. Die Zuordnung der Allele zu Haplotypen erfolgte unter Minimierung der bei den Töchtern resultierenden Crossover (**Abbildung 2**).

Patientin AC besitzt ein mütterliches X-Chromosom, in dem innerhalb des untersuchten Bereichs keine Rekombination stattgefunden hat. Das mütterliche Chromosom der Patientin LC weist zwei Crossover auf, wobei der zwischen den Crossovern liegende Abschnitt vom selben mütterlichen Chromosom stammt, das auch bei AC vorliegt. Das proximale Crossover liegt zwischen den Markern DXS1003 und AR.PCR1 in einem Intervall von ca.18 Mbp auf dem langen Arm des Chromosoms. Das distale Crossover ist zwischen DXS1202 und AFMa082xb9 in einem Intervall von 3,05 Mbp auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert. Eine weitere Eingrenzung dieses Intervalls war nicht möglich, da die innerhalb dieses Bereichs liegenden Marker DXS1061, DXS8039 und DXS1218 in der Familie nicht informativ waren. Von Patientin VC stand nur sehr wenig, aus histologischen Präparaten gewonnene DNA zur Verfügung, daher wurden hier nur Marker getestet, die der weiteren Eingrenzung des bei den beiden anderen Schwestern identifizierten gemeinsamen Haplotyps dienten. Mit den bei VC untersuchten Markern konnte ein Crossover zwischen den Markern MAOB.PCR1 und DXS1003 in einem Intervall von ca. 1,7 Mbp lokalisiert werden. Dadurch läßt sich der bei allen drei Schwestern vorliegende gemeinsame Haplotyp auf ein das *DAX1*-Gen einschließendes Intervall zwischen DXS1202 und DXS1003 eingrenzen (**Abbildungen 1 und 2**). Die Größe dieses Abschnitts liegt zwischen 13,6 und 15,7 Mbp.

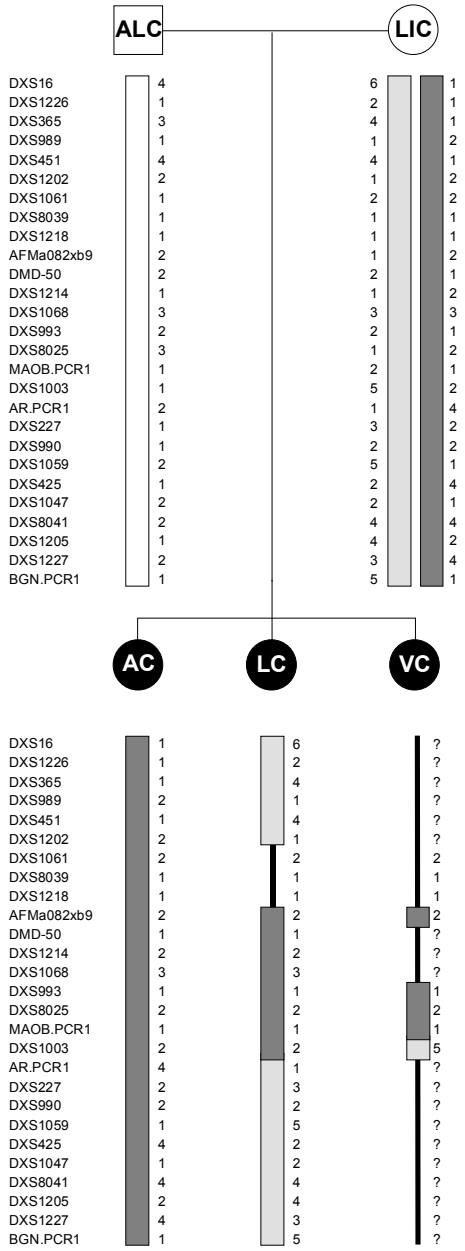


ABBILDUNG 2: Stammbaum mit ermittelten X-chromosomalen Haplotypen.

Markerpositionen, an denen das Allel keinem mütterlichen Chromosom zugeordnet werden konnte, oder Positionen von Markern, die nicht getestet wurden sind als schwarzer Balken dargestellt.
? Marker,die nicht getestet worden sind.

3.1.4 Bestimmung der Anzahl der Kopien des *DMRT1*-Gens

XY-Geschlechtsumkehr kann auch durch Deletionen des terminalen Bereichs von Chromosom 9p verursacht werden. Ein Kandidatengen hierfür ist *DMRT1*. Zur Feststellung der bei den Patientinnen mit Swyer-Syndrom vorhandenen Anzahl an Genkopien sollte ebenfalls eine quantitative Auswertung von zwei Southern Blots

erfolgen. Die DNA von AC, LC und LIC, sowie DNA von gesunden Kontrollpersonen wurde mit *Hin*dIII verdaut. Da die zunächst für die Hybridisierung verwendete *DMRT1*-cDNA-Sonde für eine quantitative Auswertung zu viele und interindividuell variable Banden lieferte, wurde ein als Hybridisierungssonde geeignetes 273 bp umfassendes Fragment aus Exon 1 (hDMT1MH1) über PCR amplifiziert und in pBlueskript II SK+/- kloniert. Als Referenzsonde für die quantitative Auswertung diente wiederum pC63. Die Ermittlung der Anzahl an Genkopien erfolgte wie für *DAX1* beschrieben durch Messen der Hybridisierungssignale im Phosophor Imager mit anschließender Auswertung über das 'Filter'-Programm (**Tabelle 2**). Für die untersuchten gesunden Kontrollpersonen wurden relative Signalintensitäten von ca. 100% ermittelt, die den tatsächlich vorhandenen zwei Genkopien entsprechen. Die Mittelwerte der Signalintensitäten bei den Patientinnen AC und LC lagen bei 98,2% bzw. 88,0% und entsprechen ebenfalls je zwei Genkopien. Auch bei LIC liegen mit einem Wert von 120,5% zwei *DMRT1*-Kopien vor.

TABELLE 2: Relative Signalintensitäten und Anzahl der *DMRT1*-Kopien

Aus den durch das 'Filter-Programm' ermittelten relativen Signalintensitäten beider Filter wurde für Patienten und Kontrollen der Mittelwert berechnet. Daraus wurde die entsprechende Anzahl der *DMRT1*-Kopien abgeleitet.

Patient / Kontrolle	Relative Signalintensitäten (%)			*DMRT1*-Kopien
	Filter 1	Filter 2	Mittelwert	
Kontrolle ♀	104,9	97,6	101,3	2
Kontrolle ♀	93,1	83,4	88,3	2
Kontrolle ♂	124,1	91,0	107,6	2
Kontrolle ♂	96,9	112,3	104,6	2
AC	90,4	105,9	98,2	2
LC	83,3	92,7	88,0	2
LIC (Mutter)	112,8	128,2	120,5	2

3.1.5 Segregationsanalyse mit Markern von Chromosom 9p23-p24

Da bis jetzt jedoch noch nicht gezeigt werden konnte, daß Deletionen des *DMRT1*-Gens tatsächlich für die durch 9p-Deletionen verursachte Geschlechtsumkehr verantwortlich sind, müssen auch andere Mechanismen, wie z. B. Mutationen in *DMRT1*, oder auch Mutationen benachbarter Gene als Ursache in Betracht gezogen werden. Um die generelle Möglichkeit einer krankheitsverursachenden Mutation in 9p23-p24 bei den vorliegenden Patientinnen zu überprüfen, wurde eine Segregationsanalyse mit sieben polymorphen PCR-Markern aus diesem Abschnitt von Chromosom 9 durchgeführt (**Abbildung 3**). Die Zuordnung der Allele zu Haplotypen erfolgte unter Minimierung der bei den Töchtern resultierenden Crossover. Die Darstellung der ermittelten Haplotypen erfolgte über das Programm 'Cyrillic' (**Abbildung 4**).

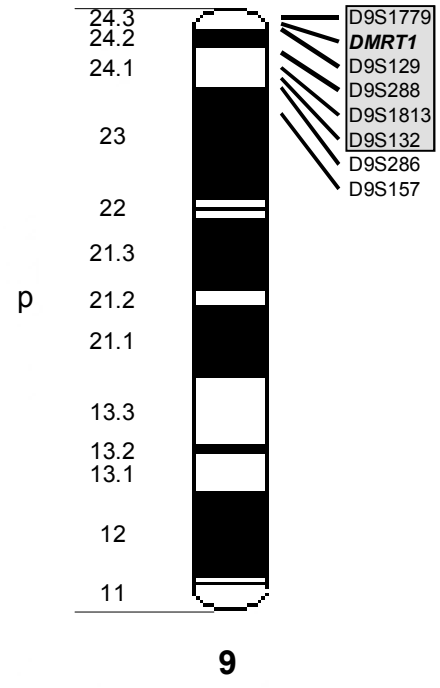


ABBILDUNG 3: Anordnung der analysierten Marker auf Chromosom 9p.

Die Anordnung der Marker ist aus GDB entnommen (http://gdbwww.gdb.org).
In dem grau unterlegten Abschnitt besitzen alle drei Schwestern denselben Haplotyp.

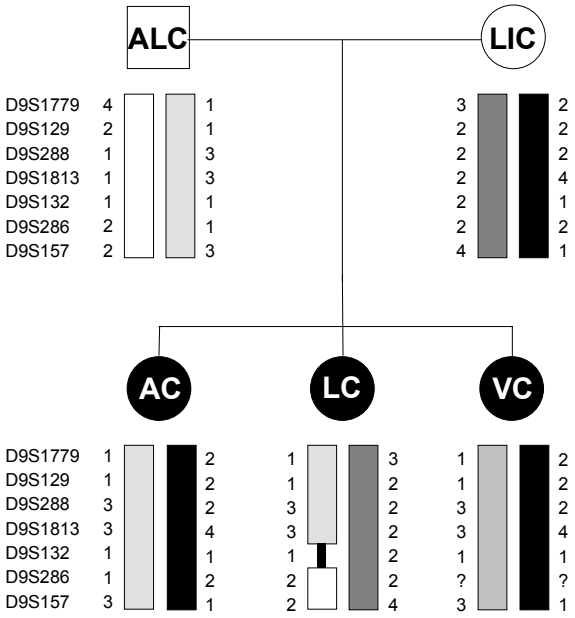


ABBILDUNG 4: Stammbaum mit ermittelten Haplotypen von Chromosom 9p.

Der schwarze Balken steht an Positionen, für die der getestete Marker nicht informativ war.
? Der Marker konnte auf der DNA von VC nicht amplifiziert werden.

Die Patientinnen besitzen in der untersuchten Region unterschiedliche maternale Haplotypen. Im distalen Abschnitt liegt ein gemeinsamer paternaler Haplotyp vor. Dieser wird durch ein Crossover bei LC zwischen D9S1813 und D9S286 auf das Intervall zwischen D9S1779 und D9S286 eingegrenzt, in dem auch *DMRT1* lokalisiert ist (**Abbildungen 3 und 4**).

3.2 Untersuchungen von Kandidatengenen für die Testisdeterminierung bei *Ellobius lutescens*

Bei *Ellobius lutescens* ist auf cytogenetischer Ebene kein Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern erkennbar. Auch mit molekulargenetischen Methoden konnten bislang keine geschlechtsspezifischen Unterschiede detektiert werden. Da auch das *SRY*-Gen fehlt, ist unklar, welches Gen bei dieser Spezies die geschlechtsdeterminierende Funktion ausübt. Man geht davon aus, daß eines der bei anderen Säugetieren *SRY*-nachgeschalteten Gene diese Rolle übernommen hat. Drei mögliche Kandidatengene *Sox9*, *Dmrt1* und *Dax1* sollten in dieser Arbeit auf ein geschlechtsspezifisches Auftreten bzw. eine geschlechtsspezifische Vererbung von Allelen hin untersucht werden. Bei *Ellobius lutescens* sind weder Sequenzen noch PCR-Marker bekannt, die für eine solche Analyse eingesetzt werden könnten. Daher mußten zunächst geeignete Sequenzabschnitte isoliert und sequenziert werden, um die für die Untersuchungen benötigten polymorphen PCR-Marker (SNPs, Repeat-Längenpolymorphismen) identifizieren zu können. Es wurden gezielt nicht-kodierende DNA-Abschnitte (Introns) innerhalb der Gene, oder in unmittelbar angrenzenden Bereichen gewählt, da diese einerseits eine höhere Sequenzvariabilität aufweisen als kodierende Sequenzen und andererseits eine Kopplung zwischen dem zu untersuchenden Gen und dem potentiellen Marker vorausgesetzt werden kann.

3.2.1 Sox9

Mutationen, die das *SOX9*-Gen betreffen, sind bei Mensch und Maus als Ursache für XX-Geschlechtsumkehr beschrieben worden. *Sox9* stellt daher auch bei *Ellobius lutescens* ein Kandidatengen für die Testisdeterminierung in Abwesenheit von *SRY* dar.

3.2.1.1 Sequenzierung der Sox9-Introns

Da *SOX9* bei allen bislang untersuchten Spezies einen sehr hohen Konservierungsgrad bezüglich Struktur und Sequenz zeigt, sollte versucht werden beide Introns direkt über PCR zu amplifizieren. Dazu wurden Primer in flankierenden Exon-Abschnitten definiert, die bei Mensch und Maus zumindest im 3'-Abschnitt identische Basenabfolgen zeigen. Die PCR-Produkte eSox9I1 und eSox9I2

(vgl. **Abbildung 5**) eines männlichen *Ellobius lutescens* wurden über TOPO-TA-Klonierung kloniert und anschließend sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit der genomischen Sequenz des humanen *SOX9* (GenBank Acc. Nr. AC007461) verglichen, um sicherzustellen, daß die richtigen Fragmente amplifiziert und kloniert worden waren.

Die Introns sind auch bei *Ellobius lutescens* an den bei anderen Vertebraten beobachteten Positionen lokalisiert. Intron 1 umfaßt ca. 800 bp und ist damit um etwa 100 bp kürzer als bei Mensch (896 bp) und Maus (880 bp). Es enthält keinerlei Sequenzhomologie zum humanen Intron 1. Intron 2 besteht wie bei Mensch und Maus aus ca. 570 bp und weist außerdem über die gesamte Länge gerechnet eine Homologie von etwa 65% zur humanen Sequenz auf. Die Homologie beträgt in einem Intervall von 300 bp am 3'-Ende des Introns sogar über 80%.

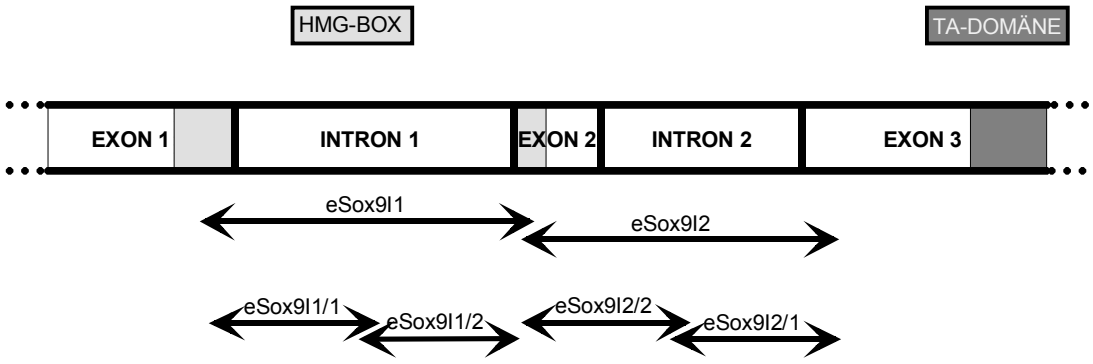


ABBILDUNG 5: Schematische Darstellung des *SOX9*-Gens der Vertebraten mit den bei *Ellobius lutescens* untersuchten PCR-Produkten.

Das SOX9-Gen besitzt bei allen bisher untersuchten Vertebraten denselben Aufbau.
Dieser ist in der Abbildung etwa maßstabsgerecht dargestellt.

Die PCR-Produkte eSox9I1 und eSox9I2 wurden sequenziert.
eSox9I1/1, eSox9I1/2, eSox9I2/1 und eSox9I2/2 wurden mit EMD-Test analysiert.

3.2.1.2 Suche nach Polymorphismen in den Sox9-Introns durch EMD

Für beide *Sox9*-Introns wurden je zwei PCR-Fragmente definiert, die durch EMD auf Polymorphismen hin untersucht werden sollten (**Abbildung 5**). Diese vier PCR-Produkte wurde bei zwei bis vier Individuen jeder der drei Familien mit EMD-Test analysiert. Bei eSox9I1/1, eSox9I1/2 und eSox9I2/2 konnten keine

Heterozygoten identifiziert werden. Im Fragment eSox9I2/1 wurde bei 24085 (F1:I,1), 24077 (F1:II,1), 24078 (F1:II,2), und 24079 (F1:II,7) je ein Peak an der Position 214 beobachtet (**Abbildung 6**).

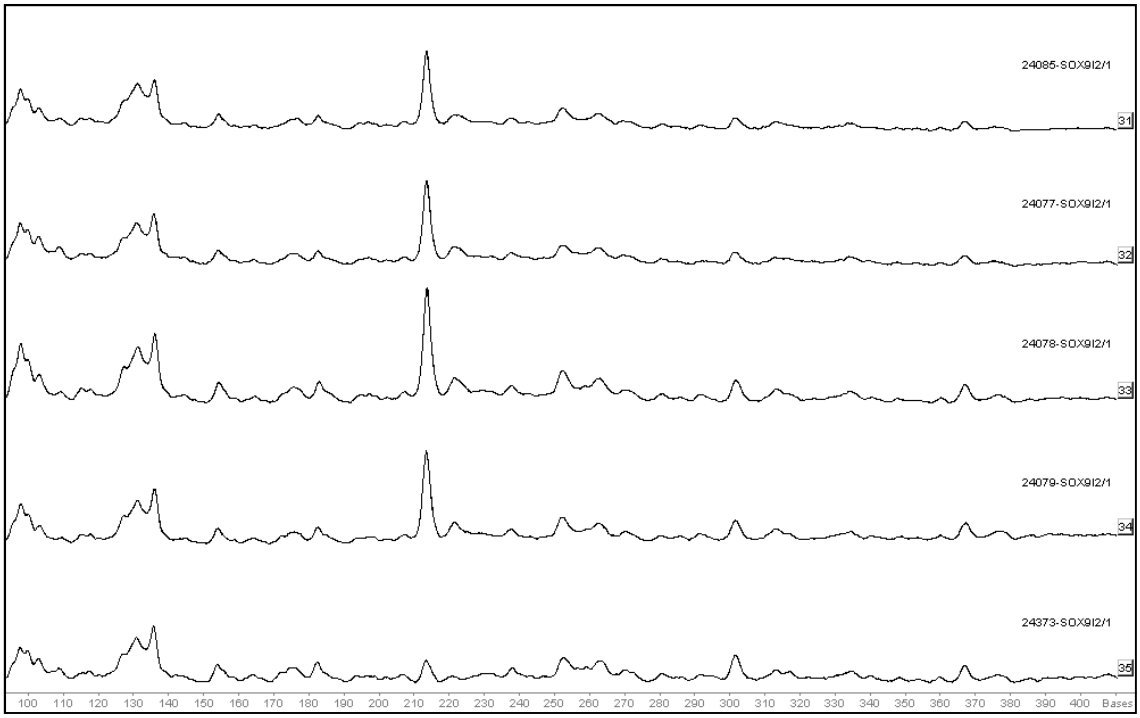


ABBILDUNG 6: Ausschnitt aus der EMD-Analyse von Fragment eSox9I2/1 bei Tieren der Familie F1 (Armenien).

Der Peak an Position 214 bei 24085, 24077, 24078 und 24079 deutet auf eine Heterozygotie der entsprechenden Individuen hin.

Um das Vorliegen eines Polymorphismus an dieser Stelle zu bestätigen, wurde das entsprechende PCR-Produkt der potentiell heterozygoten Individuen 24077 (F1:II,1) und 24078 (F1:II,2) kloniert und sequenziert. Dabei wurden zwei Allele gefunden, wobei an der erwarteten Stelle zwischen Position 220 und 223, bzw. 224 (von Primer eSox9I2/1-f aus gerechnet; s. Anhang) im einen Allel vier $(G)_4$ im anderen Allel fünf $(G)_5$ Guaninnucleotide vorlagen.

3.2.1.3 Segregationsanalyse für den Marker eSox9I2/1 in der armenischen Familie F1

Der Polymorphismus im Fragment eSox9I2/1 wurde für eine Segregationsanalyse eingesetzt. Da der eindeutige Nachweis eines Repeat-Längenpolymorphismus im EMD-Test oft problematisch ist, erfolgte die Bestimmung der Allele der einzelnen Tiere durch direkte Sequenzierung der PCR-Produkte eSox9I2/1 mit dem Primer eSox9I2/1-r mittels Cycle-Sequencing. In **Abbildung 7** sind die Sequenzen des polymorphen Abschnitts eines homozygoten und eines heterozygoten Tieres dargestellt. Bei Heterozygotie kommt es aufgrund der unterschiedlichen Repeatlänge zu einer Überlagerung der nachfolgenden Sequenzen, die somit nicht mehr interpretiert werden können.

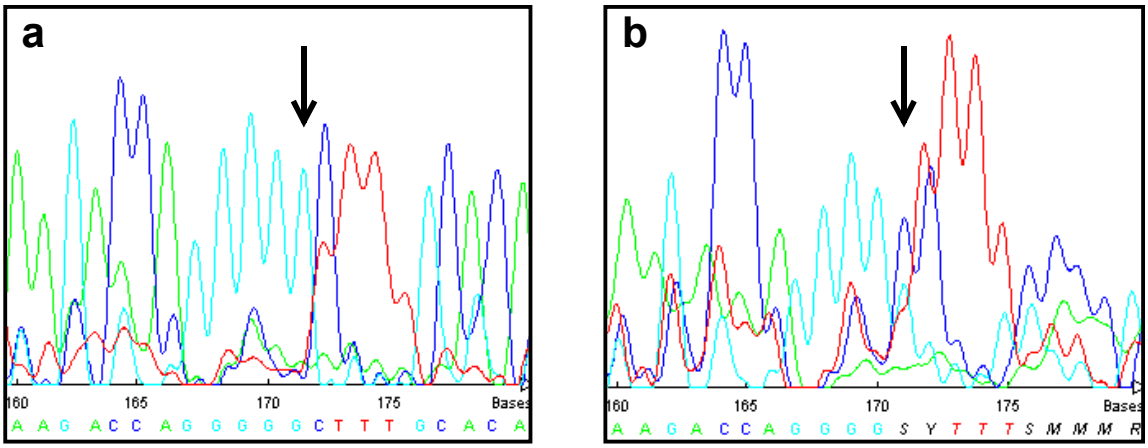


ABBILDUNG 7: Polymorpher Sequenzabschnitt aus eSox9I2/1

a Ellobius lutescens 24084 (II,4) ist homozygot für Allel $(G)_5$
b Ellobius lutescens 24381 (III,4) ist heterozygot für die Allele $(G)_4$ und $(G)_5$
Der dargestellte Ausschnitt entspricht den Basen 213 bis 235 (Sox9I2, s. Anhang)

Der Stammbaum der untersuchten Familie F1 und die für die Individuen ermittelten Allele sind in **Abbildung 8** dargestellt. Die Segregation der ermittelten Marker-Allele erfolgt in der untersuchten Familie unabhängig vom Geschlecht. So werden einerseits beide Allele des 'Großvaters' (I,1) sowohl an Söhne als auch an Töchter weitergegeben. Andererseits werden in der zweiten Generation ebenfalls beide Allele $(G)_4$ und $(G)_5$ von der Mutter (II,6) an Söhne und Töchter vererbt.

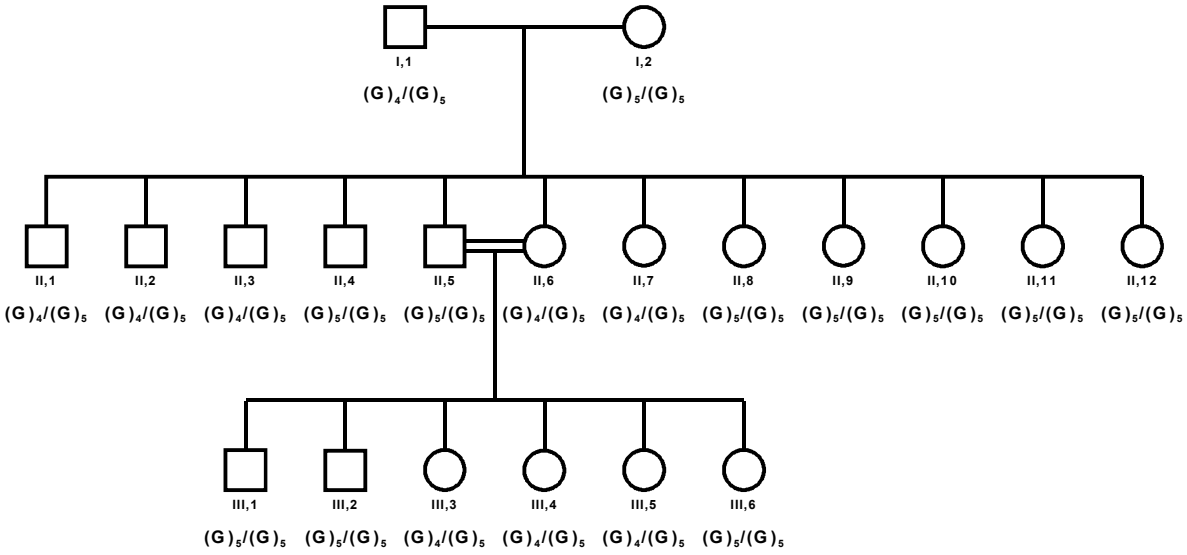


ABBILDUNG 8: Stammbaum der *Ellobius lutescens* Familie F1 mit den Allelen des Markers eSox9I2/1.

Um die geschlechtsunabhängige Segregation der Marker-Allele formal zu belegen, wurden für die beiden, für die Vererbung des Geschlechts möglichen Erbgänge männlich-dominant (entspricht weiblich-rezessiv) und männlich-rezessiv (entspricht weiblich-dominatnt) Lod Scores berechnet. Die ermittelten Allele wurden dazu in das Programm MLINK (LINKAGE Package, Lathrop et al. 1984) eingegeben. Die in Abhängigkeit von der Rekombinationshäufigkeit θ berechneten Lod Scores sind in **Tabelle 3** dargestellt. Für einen männlich-dominanten Erbgang wurden Lod Scores $Z < -2$ für Rekombinationshäufigkeiten zwischen $\theta = 0$ und 0,05 ermittelt. Bei einer angenommenen männlich-rezessiven Vererbung sind die Lod Scores $Z < -2$ für $\theta = 0$ bis 0,18.

TABELLE 3: Lod Scores für Kopplung von Geschlecht und eSox9I2/1-Allelen.

Die Berechnung der Lod Scores Z in Abhängigkeit von der Rekombinationshäufigkeit θ erfolgte mit dem Programm MLINK. Die Analyse wurde für einen männlich-dominanten und für einen männlich-rezessiven Erbgang durchgeführt.

Rekombinations-häufigkeit (θ)	Z(θ) bei ♂-dom. Erbgang	Z(θ) bei ♂-rez. Erbgang
0	$< -10^{19}$	$< -10^{19}$
0,01	-4,72	-8,20
0,02	-3,55	-6,70
0,05	-2,07	-4,72
0,10	-1,05	-3,24
0,15	-0,55	-2,38
0,16	-0,48	-2,25
0,17	-0,41	-2,12
0,18	-0,36	-2,00
0,19	-0,30	-1,89
0,20	-0,26	-1,79
0,25	-0,09	-1,33

3.2.2 Dmrt1

Dmrt1 wird bei den Säugetieren testisspezifisch exprimiert. Da die Expression bereits vor der Testisdifferenzierung beginnt wird vermutet, daß *Dmrt1* an der Testisdeterminierung beteiligt ist. Aufgrund der Lokalisation auf dem Z-Chromsom und der testisspezifischen Expression wird *Dmrt1* als möglicher Initiator der Testisentwicklung bei Vögeln diskutiert. Daher kann *Dmrt1* auch als Kandidatengen für die testisinduzierende Funktion bei *Ellobius lutescens* angesehen werden.

3.2.2.1 Sequenzierung von Dmrt1-Abschnitten bei Ellobius lutescens

Da zu Beginn dieser Arbeit nur cDNA-Sequenzen des *DMRT1*-Gens von Mensch und Huhn bekannt waren, und daher wenig Information zur Konservierung und Struktur des Gens vorlagen, war eine gezielte Amplifikation von Intron-Sequenzen bei *Ellobius lutescens* nicht möglich. Zur Ermittlung der zur Definition von PCR-Markern benötigten Sequenzen sollte deshalb eine genomische ZAP Express Bibliothek nach *Dmrt1*-spezifischen Sequenzen durchsucht werden. Da die Positionen der Introns nicht bekannt waren, gelang es nicht, eine *Ellobius lutescens*-spezifische *Dmrt1*-Sonde mit PCR-Primern, die auf der humanen cDNA-Sequenz definiert waren zu amplifizieren. Erst durch einen Vectorette-Ansatz mit Nested Primern war es möglich über das auf der humanen cDNA definierte, spezifische Nested-Primer-Paar (DMT1d1N-r / DMT1d2N-r) ein 435 bp umfassendes, aus Abschnitten von Intron 2 und Exon 3 bestehendes Fragment (eDMT1) zu amplifizieren und zu klonieren. Beim Durchsuchen der genomischen ZAP Express Bibliothek mit dieser Sonde konnten zwei identische λ-Klone isoliert werden (λeDmt1-11A, λeDmt1-30A). Der Klon λeDmt1-11A wurde durch *IN VIVO*Excision in ein pBK-CMV Phagemid (PeDmt1-11A) überführt (**Abbildung 9**). Das gesamte, ca. 5,6 kbp umfassende Insert wurde sequenziert. Ein FASTA-Vergleich der ermittelten Sequenz mit der humanen genomischen *DMRT1*-Sequenz (GenBank Acc. Nr. AL136365) ergab, daß das Insert aus dem kompletten Exon 3 und Anteilen von Intron 2 und Intron 3 besteht. Die Homologie zwischen dem humanen Exon 3 und Exon 3 von *Ellobius lutescens* beträgt ca. 82%. Zwischen den Intron-Sequenzen wurde keine Homologie gefunden.

3.2.2.2 Suche nach Polymorphismen in der Dmrt1-Sequenz von Ellobius lutescens mit EMD-Test

Für die Identifizierung von Polymorphismen mittels EMD-Analyse wurden auf der ermittelten *Dmrt1*-Sequenz acht PCR-Primer-Paare definiert (**Abbildung 9**). Die amplifizierten Fragmente von zwei bis fünf Individuen pro Familie wurden untersucht. In den Fragmenten eDMT1.2, -.3, -.5, -.6, -.7, -.8, und -.9 wurden keine Sequenzunterschiede detektiert.

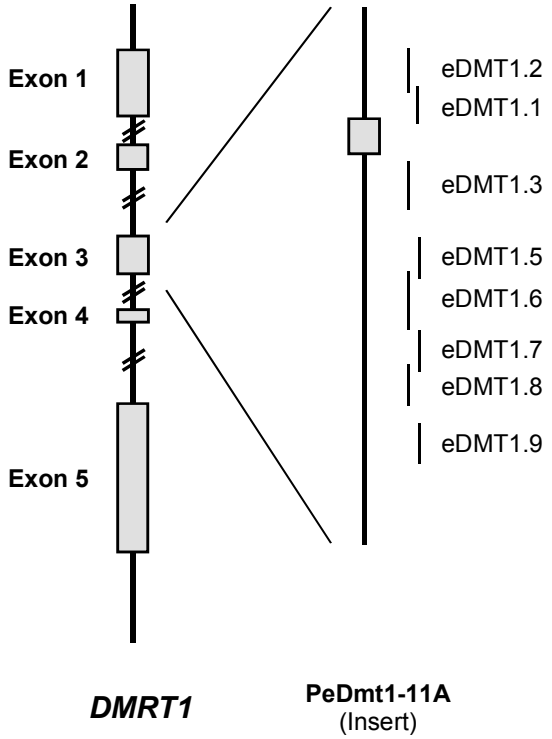


ABBILDUNG 9: Genomische Lokalisation des PeDmt1-11A-Inserts und der mit EMD-Analyse untersuchten PCR-Produkte

Die Größenverhältnisse der Exons in der schematischen Darstellung des *DMRT1*-Gens sind etwa maßstabsgerecht wiedergegeben.
Die Anteile von Exon 3, sowie von Intron 2 und 3 am PeDmt1-11A-Insert und die Anordnung der PCR-Fragmente sind ebefalls etwa maßstabsgerecht dargestellt.

Im Fragment eDMT1.1 wurde bei den Tieren Ello41, Ello42 und Ello44 aus dem Iran Heterozygotie festgestellt, während Ello48 homozygot ist (**Abbildung 10**). Es traten Peaks an vier Positionen auf (60, 277, 309, 325), wobei es sich bei den Peaks an den Positionen 60 und 277 um korrespondierende, also durch den-

selben Polymorphismus verursachte Peaks handelt. Die Peaks lagen bei verschiedenen Individuen in unterschiedlichen Kombinationen vor. Bei Ello41 waren alle vier Peaks vorhanden, Ello42 und Ello44 zeigten je zwei Peaks.

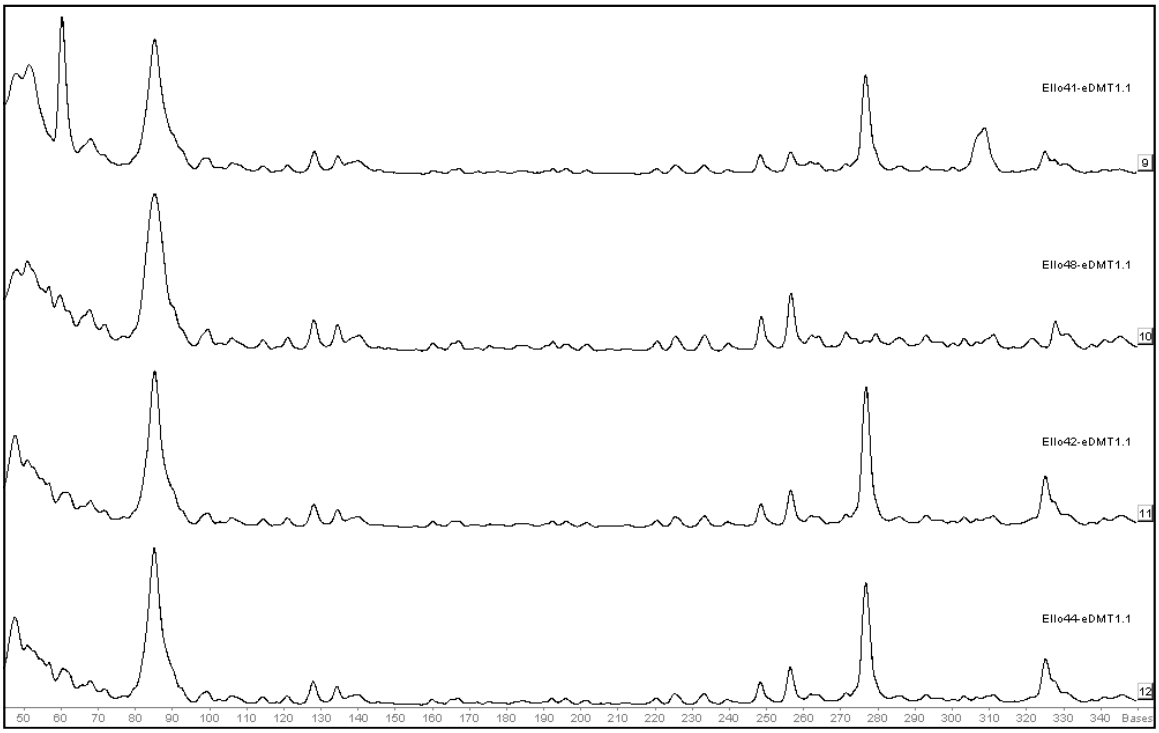


ABBILDUNG 10: Ausschnitt aus der EMD-Analyse von Fragment eDMT1.1 bei Tieren aus dem Iran.

Der Peak an Position 85 tritt bei allen untersuchten Individuen auf und ist somit unspezifisch. Spezifische Peaks sind an den Positionen 60, 277, 309 und 325 vorhanden.

Um die Sequenz der zugehörigen Allele des Markers eDMT1.1 bestimmen zu können, wurden die PCR-Produkte der vier Tiere Ello41, Ello42, Ello44 und Ello48 kloniert und sequenziert. Dabei wurden drei variable Positionen identifiziert (274, 304, 322), die den durch EMD ermittelten Positionen entsprechen. Diese führen zum Auftreten von drei unterschiedlichen Allelen (Allele 1 - 3 in **Abbildung 11**).
Um festzustellen welches Allel bei den homozygoten armenischen Tieren vorliegt, wurden die PCR-Produkte von je einem Individuum jeder Familie (24085,F1; 24374, F2) kloniert und sequenziert. Beide Tiere waren homozygot für Allel 1.

3.2.2.3 Analyse des geschlechtsspezifischen Auftretens von Haplotypen

Da der polymorphe Marker eDMT1.1 in der vorliegenden iranischen Familie nicht informativ war, sollte versucht werden, über eine Bestimmung der Allele bei 23 nicht verwandten Tieren aus der iranischen Population ein geschlechtsspezifisches oder geschlechtsunabhängiges Auftreten von *Dmrt1*-Allelen nachzuweisen. Die eDMT1.1-Fragmente dieser 23 Tiere wurden zunächst über EMD-Analyse vorgetestet, um homozygote und heterozygote Individuen zu identifizieren. Die PCR-Produkte von 19 Tieren wurden kloniert und sequenziert, bei vier weiteren Tieren konnten die Allele anhand des EMD-Tests eindeutig festgestellt werden. Zur Identifikation beider Allele bei heterozygoten Individuen mußten zwei bis zehn Klone sequenziert werden. Dabei wurde ein zusätzliches Allel (Allel 4 in **Abbildung 11**) gefunden. Die ermittelten Haplotypen sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

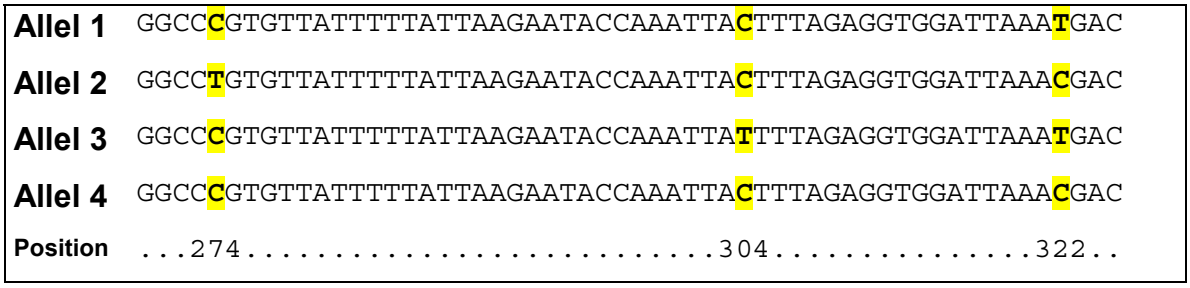


ABBILDUNG 11: Polymorpher Sequenz-Abschnitt der vier eDMT1.1-Allele

Die Positionen bezieht sich auf das PCR-Produkt eDMT1.1 (356 bp Länge).
(Position 1 entspricht der 5'-Base des Primers eDMT1.1-f.)

TABELLE 4: Allelkombinationen für eDMT1.1 bei 23 nicht-verwandten Tieren

Alle untersuchten Tiere stammen aus einer iranischen Population.
Die Bestimmung der Allele erfolgte durch EMD und Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten.

eDMT1.1-Allelkombinationen		**1** 1/1	**2** 1/2	**3** 1/3	**4** 1/4	**5** 2/2	**6** 2/3	**7** 2/4	**8** 3/3	**9** 3/4	**10** 4/4
Tier	Geschlecht										
Ello1	♂		X								
Ello3	♀			X							
Ello4	♀			X							
Ello5	♂					X					
Ello8	♂		X								
Ello9	♀						X				
Ello11	♂			X							
Ello14	♀					X					
Ello16	♀		X								
Ello17	♀					X					
Ello18	♂						X				
Ello19	♀						X				
Ello20	♂					X					
Ello23	♂			X							
Ello24	♂				X						
Ello27	♀		X								
Ello32	♂					X					
Ello33	♂		X								
Ello34	♂					X					
Ello35	♀						X				
Ello37	♂						X				
Ello41	♂						X				
Ello48	♀	X									
Anzahl	♂ / ♀	0 / 1	3 / 2	2 / 2	1 / 0	4 / 2	3 / 3	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0

3.2.2.4 Auswertung der Allelverteilung des Markers eDMT1.1 bei den 23 nicht-verwandten Tieren aus der iranischen Population

Um eine mögliche Assoziation zwischen Marker-Allelen und dem Geschlecht der untersuchten Tiere zu testen, wurden die ermittelten Daten mittels EHPLUS-Programm (Xie et al. 1993, Zhao et al. 2000) sowohl für einen männlich-dominanten, als auch für einen männlich-rezessiven Erbgang ausgewertet. Die Wahrscheinlichkeiten für eine Assoziation von Marker-Allelen und Geschlecht

(Hypothese H_1), und die Wahrscheinlicht dafür, daß keine Assoziation (Hypothese H_0) vorliegt, werden in Form des dekadischen Logarithmus ('log likelihood') angegeben. Um die Evidenz für das Vorliegen einer Assoziation statistisch zu testen wurde eine χ^2-verteilte Größe nach der Formel $-2 \log_{10}[L(H_0)/L(H_1)] \sim \chi^2$ berechnet ('likelihood ratio test'). Die Anzahl der Freiheitsgrade (df) entspricht $df(H_1) - df(H_0)$ (Terwilliger & Ott, 1994). Die zugehörigen Signifikanzniveaus (p) wurden mit dem Programm CHIPROB (Utility programs for analysis of genetic linkage; ©Ott, 1988) ermittelt. 'Log likelihoods' und χ^2-Werte mit Freiheitsgraden und zugehörigen P-Werte sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

TABELLE 5: Statistische Auswertung der Allelverteilung des Markers eDMT1.1

Die Testgröße χ^2 wird nach der Formel $-2 \log_{10}[L(H_0)/L(H_1)] \sim \chi^2$ berechnet.
Zur Berechnung des Signifikanzniveaus p wurde das Programm CHIPROB verwendet.

Angenommener Erbgang	Hypothese	log(L)	df	χ^2	p
♂ dominant	H_0	-39,28	4	0,27	1,00
	H_1	-39,14	14		
♂ rezessiv	H_0	-39,28	4	0,13	1,00
	H_1	-39,21	14		

Hypothese H_0: keine Assoziation zwischen Marker-Allelen und Geschlecht
Hypothese H_1: Assoziation zwischen Marker-Allelen und Geschlecht
log(L): dekadischer Logarithmus der ermittelten Wahrscheinlichkeit
df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Signifikanzniveau

Weder für einen dominanten noch für einen rezessiven Erbgang des männlichen Geschlechts konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Assoziation (H_1) und der Wahrscheinlichkeit dafür, daß keine Assoziation vorliegt (H_0) nachgewiesen werden. D. h. es besteht keine Evidenz für eine Assoziation von Geschlecht und eDMT1.1-Marker-Allelen.

3.2.2.5 Lokalisation von Dmrt1 bei Ellobius lutescens

Da Hinweise dafür existieren, daß der testisinduzierende Faktor bei *Ellobius lutescens* auf dem proximalen langen Arm von Chromosom 1 liegen könnte, erschien es sinnvoll, die Lokalisation des Kandidatengens *Dmrt1* zu überprüfen. Dazu wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung durchgeführt, wobei das Phagemid PeDMT1-11A als Sonde verwendet wurde. Es wurde eine Lokalisation von *Dmrt1* auf Chromosom 1p im telomernahen Bereich ermittelt (**Abbildung 12**).

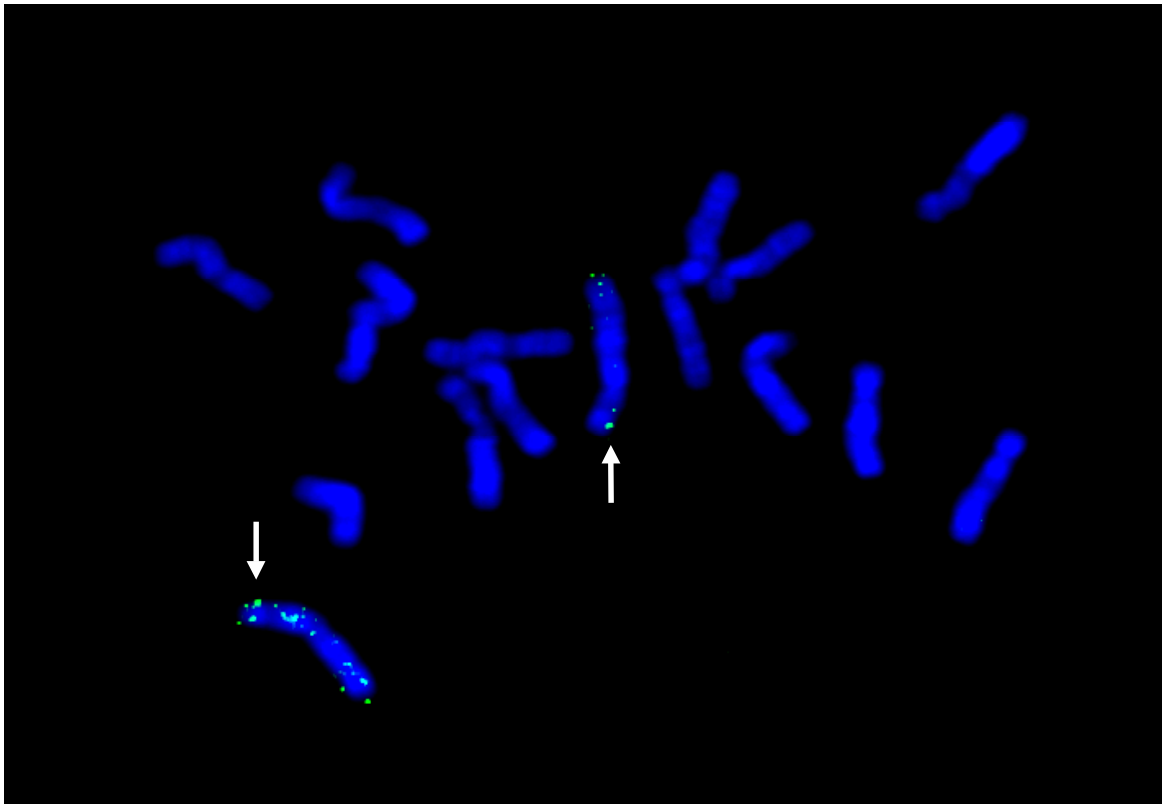


ABBILDUNG 12: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit der Sonde PeDmt1-11A auf Chromosomen von *Ellobius lutescens*.

Die *Dmrt1*-spezifischen Signale befinden sich auf Chromosom 1pter.

(Um die spezifischen Signale hervorzuheben, wurden Hintergrundsignale auf den anderen Chromosomen mittels Bildverarbeitung entfernt.)

3.2.3 Dax1

DAX1 ist bei Mensch und Maus in dosisabhängiger Weise an der Geschlechtsdeterminierung beteiligt. Eine Funktion bei der Initiation der Testisentwicklung bei *Ellobius lutescens* ist ebenfalls denkbar. Diese Hypothese sollte nach Möglichkeit durch eine Segregationsanalyse mit polymorphen Marker aus benachbarten Sequenzabschnitten des *Dax1*-Gens untersucht werden.

Aufgrund der fehlenden meiotischen Rekombination des X-Chromosoms von *Ellobius lutescens* kann durch die Analyse eines beliebigen X-chromosomalen Markers gleichzeitig eine mögliche geschlechtsspezifische Vererbung des ganzen X-Chromosoms untersucht werden. Solche Studien scheiterten bisher, da alle bislang untersuchten X-chromosomalen Marker monomorph waren (Vogel et al. 1998).

3.2.3.1 Sequenzierung von Dax1-Abschnitten bei Ellobius lutescens

Die zur Definition von PCR-Markern benötigte Sequenzinformation für *Dax1* sollte durch Isolation eines λ-Klons und nachfolgender Sequenzierung ermittelt werden. Zum Screening der ZAP Express-Bibliothek wurde die *Ellobius*-spezifische Sonde eDax1 verwendet. Diese besteht aus einem ca. 280 bp umfasenden Abschnitt von Exon 1, der über Nested-PCR amplifiziert und dann kloniert wurde. Die dazu verwendeten Primerpaare MM2 und MM3 wurden auf Sequenzbereichen definiert, die bei Mensch und Maus identisch sind. Beim Durchsuchen der Bibliothek wurde der λ-Klon λeDax1-21B identifiziert, isoliert und durch *IN VIVO* Excision in das pBK-CMV-Phagemid PeDax1-21B überführt. Das Insert umfaßt ca. 6,3 kbp. Die Sequenzierung und ein anschließender FASTA-Vergleich mit der humanen genomischen Sequenz (GenBank Acc. Nr. U31929) bestätigten, daß es sich um Teile des *Dax1*-Gens handelte. Neben dem kompletten Exon 1 sind auch Abschnitte von Intron 1 bzw. des proximal der kodierenden Sequenz lokalisierten Bereichs vorhanden (**Abbildung 13**). Sequenzhomologien zum humanen *DAX1* beschränken sich auf Exon 1 und ein Intervall von ca. 110 bp 5’ der kodierenden Sequenz. Die Homologie beträgt zwischen 75 und 80%.

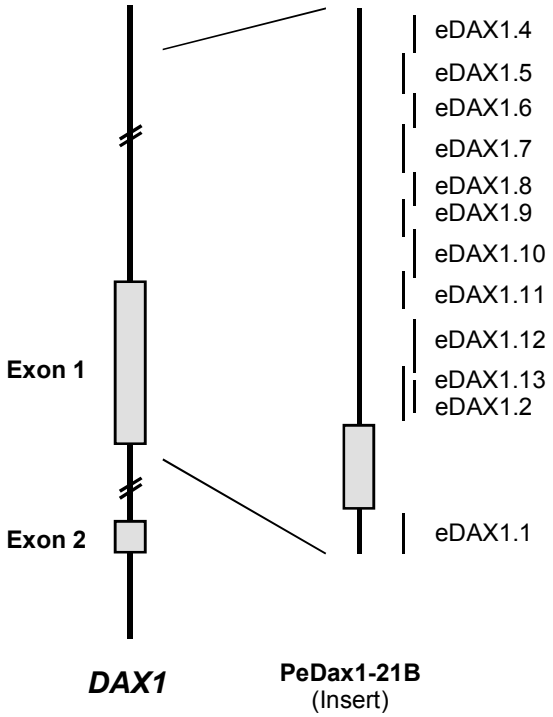


ABBILDUNG 13: Genomische Lokalisation des PeDax1-21B-Inserts und der mittels EMD-Analyse untersuchten PCR-Produkte

Die Größenverhältnisse der Exons in der schematischen Darstellung des *DAX1*-Gens sind etwa maßstabsgerecht wiedergegeben.
Die Anteile von Exon 1, sowie von Intron 2 bzw. der proximal von Exon 1 gelegenen Sequenzen am PeDax1-21B-Insert und die Anordnung der PCR-Fragmente sind ebenfalls etwa maßstabsgerecht dargestellt.

3.2.3.2 Suche nach Polymorphismen in der Dax1-Sequenz von Ellobius lutescens mit dem EMD-Test

Auf der ermittelten *Dax1*-Sequenz wurden 13 PCR-Fragmente für die Suche nach Polymorphismen mittels EMD-Test definiert (**Abbildung 13**). Aufgrund der Hemizygotie des X-Chromosoms bei *Ellobius lutescens* mußten für die EMD-Analyse zur Identifizierung von interindividuellen Sequenzunterschieden die PCR-Produkte verschiedener Individuen kombiniert eingesetzt werden. Für jeden Marker wurden verschiedene Ansätze analysiert. Dabei wurde von jeder Familie ein männliches und ein weibliches Tier untersucht. Diese wurden einerseits gegeneinander, andererseits aber auch gegen Individuen aus den beiden anderen Familien getestet, um sowohl Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen einer Familie, als auch Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Populationen aus dem Iran

und aus Armenien detektieren zu können. Innerhalb der Familien wurden keine Sequenzvariationen gefunden.

Durch einen Vergleich zwischen iranischen und armenischen Tieren konnte ein Polymorphismus in Fragment eDAX1.10 identifiziert werden. Die Sequenzierung dieses Abschnitts zeigte, daß an dieser Position ein Längenunterschied eines Repeats von Adenin-Nukleotiden vorliegt. Dieser Polymorphismus konnte jedoch nicht zur Analyse des geschlechtsspezifischen Auftretens von *Dax1*-Allelen eingesetzt werden, da er keine Differenzierung von Individuen innerhalb der beiden Populationen ermöglicht.

Aufgrund des bereits bekannten Fehlens unterschiedlicher Allele X-chromosomaler (CA)-Repeat-Marker bei *Ellobius lutescens* (Vogel et al. 1998) und der hier beobachteten geringen Inzidenz von Sequenzvarianten in einem DNA-Abschnitt von ca. 5 kb bei 6 untersuchten Tieren erschien eine Fortsetzung der Suche nach Polymorphismen im gegebenen zeitlichen Rahmen nicht aussichtsreich.

3.2.3.3 Lokalisation von Dax1 bei Ellobius lutescens

Da aus den anhand der *Dax1*-flankierenden Sequenzen ermittelten Daten auch Aussagen für das gesamte X-Chromosom abgeleitet werden sollten, erschien es sinnvoll, die X-chromosomale Lokalisation von *Dax1* bei *Ellobius lutescens* zunächst zu verifizieren. Dies erfolgte mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, wobei das Phagemid PeDax1-21B als Sonde eingesetzt wurde. Dabei wurde eine Lokalisation von *Dax1* auf dem langen Arm des X-Chromosoms ermittelt (**Abbildung 14**).

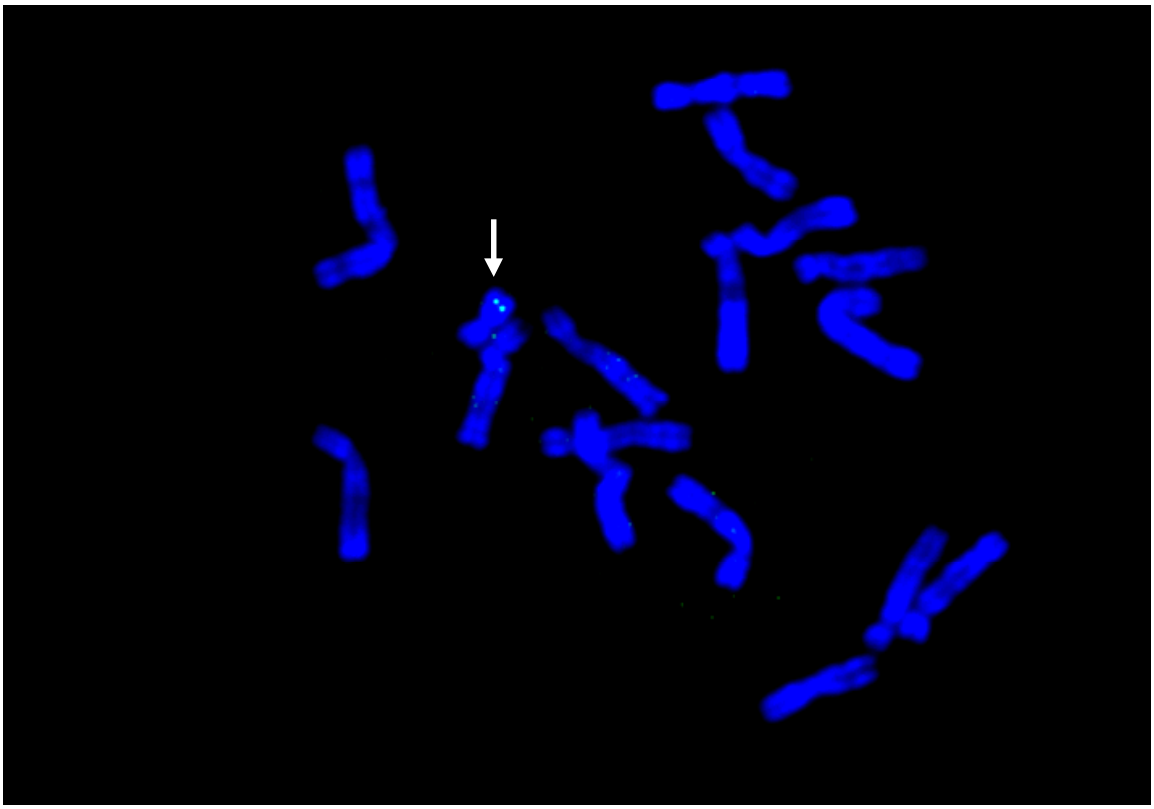


ABBILDUNG 14: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit der Sonde PeDax1-21B auf Chromosomen von *Ellobius lutescens*.

Die *Dax1*-spezifischen Signale befinden sich auf Chromosom Xq.

4 DISKUSSION

Die Gene und insbesondere die Mechanismen der Geschlechtsdeterminierung sind noch weitgehend unbekannt. Aus Studien von Organismen, die Abweichungen von der bei Säugetieren und Menschen üblichen Gonosomenkonstitution XX bei weiblichen und XY bei männlichen Individuen zeigen, erwartet man neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an zwei derartigen 'Modellen' - dem familiär auftretenden Swyer-Syndrom und dem Nager *Ellobius lutescens* - durchgeführt.

4.1 Swyer-Syndrom

Patientinnen mit Swyer-Syndrom zeigen bei der Geburt einen unauffällig weiblichen Phänotyp. Sie besitzen jedoch einen männlichen Karyotyp und entwickeln weder funktionsfähige Ovarien noch Testes. Daher wird das Krankheitsbild auch als 'reine XY-Gonadendysgenesie' bezeichnet (OMIM #306100).

Es existieren offensichtlich mehrere Mechanismen, die zur Entstehung des Swyer-Syndroms führen können. Einige davon, sind bereits bekannt, nämlich Mutationen im *SRY*-Gen und Deletionen von 9pter. Außerdem gibt es Hinweise auf eine mögliche X-chromosomale Ursache (OMIM #306100, #158170). Durch diese bekannten Mechanismen lassen sich jedoch nur wenige der Fälle erklären.

Das Fehlen weiterer Fehlbildungen ermöglicht eine Abgrenzung des Swyer-Syndroms von anderen Geschlechtsumkehrsyndromen. Daher können z. B. Mutationen in *WT1*, oder *SOX9* generell als Ursache ausgeschlossen werden, da hier keine Fälle bekannt sind, bei denen die Geschlechtsumkehr ohne weitere Fehlbildungen aufgetreten ist (Nordenskjöld et al. 1995, Kwok et al. 1996a, Meyer et al. 1997).

Durch die Möglichkeit Segregations- oder sogar Kopplungsanalysen durchzuführen, sind besonders Untersuchungen von familiären Swyer-Syndrom Fällen geeignet, um neue Erkenntisse über die Krankheitsursachen und damit auch über die Mechanismen der Geschlechtsdeterminierung zu gewinnen.

In der vorliegenden Familie zeigen alle drei Töchter ein Swyer-Syndrom. Es liegen keine Hinweise auf die Krankheitsursache vor, die aus dem Phänotyp, oder aus cytogenetischen Veränderungen abgeleitet werden könnten.

Da in der Familie keine weiteren Fälle bekannt sind, ist nicht klar welcher der Eltern Überträger der Krankheit sein könnte. Ziel der Untersuchungen war es zunächst, die bisher bekannten möglichen Ursachen für die Erkrankung in der Familie zu überprüfen. Aufgrund des familliären Auftretens der Krankheit konnte vorausgesetzt werden, daß bei allen drei Schwestern dieselbe Krankheitsursache vorliegt, und daß es somit ausreicht, Analysen bei jeweils einer der Schwestern durchzuführen.

4.1.1 Ausschluß von Mutationen des SRY-Gens als Ursache für das Swyer-Syndrom in der untersuchten Familie

Da Mutationen des *SRY*-Gens die häufigste Ursache für das Swyer-Syndrom darstellen, wurde zuächst die kodierende Region des Gens untersucht. Der sequenzierte Abschnitt umfaßte nahezu die vollständige kodierende Sequenz einschließlich der HMG-Box und zeigte eine komplette Übereinstimmung mit der publizierten Referenzsequenz (GenBank Acc. Nr. L10102). *SRY*-Mutationen, die zur Geschlechtsumkehr führen, sind fast ausschließlich in der HMG-Box lokalisiert. Nur in wenigen Fällen wurden Mutationen in der kodierenden Sequenz außerhalb der HMG-Box identifiziert (Koopman 1999). Es existieren allerdings Hinweise darauf, daß auch Mutationen außerhalb der kodierenden Region zur Geschlechtsumkehr führen können (McElreavey et al. 1992, McElreavey et al. 1996). Eine Mutationssuche in den *SRY*-benachbarten nicht-kodierenden Sequenzen ist problematisch. Es ist noch nicht genau bekannt, welche 5'- bzw. 3'-gelegenen Sequenzbereiche für die Expression von SRY von Bedeutung sind, sodaß mindestens ein Abschnitt von mehreren kbp untersucht werden müßte, um regulatorische Sequenzen in jedem erdenklichen Abstand mit ausreichender Wahrscheinlichkeit zu erfassen. Es wäre auch schwierig festzustellen, ob es sich im Falle einer identifizierten Abweichung von der Referenzsequenz, selbst wenn sie bei den Töchtern und beim Vater vorliegen würde, um einen Polymorphismus, oder eventuell um eine Mutation mit unvollständiger Penetranz handelt. Aufgrund der geringen Inzidenz von Mutationen außerhalb der kodierenden Sequenz von *SRY* bei Patientinnen mit Swyer-Syndrom, ist eine derart aufwendige Untersuchung wenig erfolgversprechend und aufgrund der unklaren Interpretationsmöglichkeiten im vorliegenden Fall nicht sinnvoll (Schmitt-Ney et al. 1995, Kwok et

al. 1996b, Veitia et al. 1997). Daher kann eine Mutation des *SRY*-Gens in der vorliegenden Familie mit großer Wahrscheinlichkeit als Ursache für das Swyer-Syndrom ausgeschlossen werden.

4.1.2 Analyse einer möglichen X-chromosomalen Vererbung des Swyer-Syndroms

Duplikationen der in Xp21.3 lokalisierten DSS-Region führen zur XY-Gonadendysgenesie, die auf eine zweifache Dosis des *DAX1*-Gens zurückzuführen ist (Bardoni et al. 1994, Zanaria et al. 1994, Swain et al 1998). Die betroffenen Patientinnen zeigen neben der Geschlechtsumkehr meist zahlreiche weitere Fehlbildungen, die allerdings vermutlich durch Duplikationen oder Unterbrechungen benachbarter Gene durch die zugrundeliegende Chromosomenaberration verursacht werden. Daher kann spekuliert werden, daß eine Mikro-Duplikation, die zytogenetisch nicht erkennbar ist und ausschließlich *DAX1* betrifft, zum Swyer-Syndrom führen könnte. Um das Vorliegen eines solchen Mechanismus in der untersuchten Familie zu überprüfen, wurde die Kopienzahl des *DAX1*-Gens bei den Patientinnen und der Mutter bestimmt. Durch quantitative Auswertung von Southern Blots, die mit einer *DAX1*-spezifischen Sonde hybridisiert wurden, konnte das Vorliegen von nur einer *DAX1*-Kopie bei den Patientinnen nachgewiesen und eine Duplikation des Gens als Ursache der Geschlechtsumkehr somit ausgeschlossen werden.

In einigen familiären Fällen wurde für das Swyer-Syndrom ein X-chromosomaler Erbgang diskutiert (De la Chapelle 1962, Moreira-Filho et al. 1979, Wolf et al. 1960, Simpson et al. 1981). Daher wurde die generelle Möglichkeit einer X-chromosomalen Vererbung in der vorliegenden Familie über eine Segregationsanalyse mit X-chromosomalen Markern untersucht. Bei allen drei Schwestern wurde ein gemeinsamer mütterlicher Haplotyp ermittelt, der zwischen DXS1202 und DXS 1003 lokalisiert ist und 13,6 bis 15,7 Mbp umfaßt.

DAX1 ist das einzige bekannte Gen, das an der Geschlechtsdeterminierung beteiligt und in diesem Abschnitt lokalisiert ist. Da eine Duplikation des *DAX1*-Gens als Ursache für die Geschlechtsumkehr bereits ausgeschlossen wurde, stellt sich die Frage, ob ein anderer *DAX1*-abhängiger Mechanismus existieren könnte, der ebenfalls zur XY-Geschlechtsumkehr führt. Bislang konnte kein Zusammen-

hang zwischen XY-Geschlechtsumkehr und Mutationen im *DAX1*-Gen hergestellt werden. Es ist jedoch bekannt, daß *DAX1*-Mutationen zu einer kongenitalen Nebennieren-Hypoplasie (AHC = adrenal hypoplasia congenita) und zum hypogonadotropen Hypogonadismus (HHG = hypogonadotropic hypogonadism) führen (Zanaria et al. 1994, Muscatelli et al. 1994). Dies legt die Vermutung nahe, daß die Geschlechtsumkehr ausschließlich durch eine erhöhte Dosis des Gens, aber nicht durch Mutationen hervorgerufen werden kann. Neben einer Erhöhung der Gendosis durch Duplikation des Gens auf DNA-Ebene, ist auch eine Dosiserhöhung auf Expressionsebene denkbar. Dafür können Mutationen im Promotorbereich verantwortlich sein, wie dies kürzlich bei der Maus für das *Sox9*-Gen beschrieben wurde (Overbeek et al. 1999). Als Mechanismus hierfür kommt, wie ebenfalls für für die bereits erwähnten transgenen *Odsex*-Mäusen postuliert, beispielsweise die fehlende Reprimierung der Expression aufgrund einer Mutation einer Repressorbindungsstelle in Frage (C. Bishop, 2nd International Symposium on The Biology of Vertebrate Sex Determination, Hawaii, 2000). Allerdings konnte in der Literatur bislang kein Fall gefunden werden, bei dem eine vergleichbare, natürlich auftretende Mutation beobachtet wurde.

Weibliche Mäuse, bei denen *Dax1* überexprimiert wird, sind phänotypisch normal (Swain et al. 1998). Daher ist anzunehmen, daß eine expressionssteigernde Mutation von *DAX1* auch beim Menschen, bei weiblichem Karyotyp keinen Effekt haben würde. Somit könnte das betreffende Allel in der untersuchten Familie auch schon bei der Mutter vorliegen. Die Mutation könnte bei ihr jedoch auch als Keimbahnmutation neu entstanden sein.

Eine Überprüfung dieser Hypothese über das Vorliegen einer expressionssteigernden Mutation könnte durch vergleichende Expressionsuntersuchungen mit dem klonierten *DAX1*-Promotor von Patienten und gesunden Kontrollpersonen durchgeführt werden. Dazu müßte allerdings ein geeignetes Zellsystem gefunden werden, da die für die Geschlechtsdeterminierung relevante Expression während eines recht kurzen Zeitraums in der embryonalen Gonadenanlage stattfindet und daher vermutlich nicht in einem beliebigen Zelltyp reproduziert werden kann. Ein weiteres Problem für die Durchführung solcher Studien liegt darin, daß relevante Elemente des *DAX1*-Promotors derzeit noch nicht bekannt, bzw. charakterisiert sind.

Andere bekannte X-chromosomale Gene, die eine Rolle bei der Geschlechtsentwicklung spielen, oder für die eine Funktion bei der Geschlechtsdeterminierung diskutiert wird, wie zum Beispiel das für den Androgenrezeptor kodierende Gen *AR*, *SOX3* oder *XH2* liegen außerhalb des hier definierten Intervalls (Lubahn et al. 1988, Graves 1995, Ion et al. 1996) und können daher in der vorliegenden Familie als Kandidatengene für das Swyer-Syndrom ausgeschlossen werden.
Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, daß innerhalb der ermittelten Region ein weiteres, noch unbekanntes, an der Geschlechtsdeterminierung beteiligtes Gen lokalisiert ist. Dafür gibt es jedoch derzeit keinerlei Evidenz und daher auch keine Möglichkeit für gezielte Untersuchungen.
Im Rahmen des Humanen Genomprojekts dürfte die vollständige Sequenz des Intervalls in Kürze vorliegen, was die Möglichkeit bieten würde, in diesem Abschnitt gezielt nach Kandidatengenen mit einer geschlechtsdeterminierenden Funktion zu suchen. Aufgrund der Größe von 15,7 Mpb könnten in diesem Bereich jedoch über 100 Gene vorliegen, die untersucht werden müßten, was mit angemessenem Aufwand nicht durchführbar ist.

4.1.3 Überprüfung möglicher 9p-gebundener Mechanismen für die Entstehung des Swyer-Syndroms

Das Monosomie-9p-Syndrom wird durch Deletionen des terminalen Abschnitts von Chromosom 9p hervorgerufen (OMIM #158170). Es handelt sich hierbei um ein Contiguous-Gene-Syndrom, das in vielen Fällen mit XY-Geschlechtsumkehr verbunden ist. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß diese durch 9p-Deletionen verursachten Krankheitsbilder - Monosomie-9p-Syndrom und Swyer-Syndrom - auch unabhängig voneinander auftreten. Beide Syndrome konnten dann auch getrennten Chromosomenregionen zugeordnet werden, wobei die Kandidatenregion für die Geschlechtsumkehr distal von der Kandidatenregion für das Monosomie-9p-Syndrom in 9p23-p24 liegt (Veitia et al. 1998).
Innerhalb der Kandidatenregion für das Swyer-Syndrom ist das *DMRT1*-Gen lokalisiert, für das aufgrund seiner frühen testisspezifischen Expression bei allen bisher untersuchten Vertebraten eine Funktion bei der Testisdeterminierung angenommen wird (Raymond et al. 1998, Raymond et al. 1999b, Moniot et al. 2000, Smith et al. 1999). Ein Nachweis dafür, daß das Swyer-Syndrom bei

9p-Deletionen durch Haploinsuffizienz von *DMRT1* verursacht wird, konnte bislang nicht erbracht werden. Daher muß theoretisch auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß ein benachbartes Gen für die Krankheitsentstehung verantwortlich ist.

Eine Bestimmung der Anzahl bei den Patientinnen AC und LC vorhandener *DMRT1*-Kopien durch quantitativ ausgewertete Southern Blots zeigte, daß bei beiden Schwestern je zwei Kopien des Gens vorliegen. Eine Deletion des kompletten *DMRT1*-Gens konnte somit als Ursache für das Swyer-Syndrom ausgeschlossen werden. Da dieser Bestimmung eine Hybridisierung auf Restriktionsfragmente zugrundeliegt, kann eine sichere Aussage über die Dosis nur für das detektierte Fragment erfolgen. Seit wenigen Monaten ist bekannt, daß *DMRT1* auf genomischer Ebene ca. 130 kbp umfaßt, und somit beim Verdau in etwa 30 - 40 Restriktionsfragmente gespalten wird. Die für die Bestimmung verwendete Hybridisierungssonde besteht aus einem Abschnitt aus Exon 1 des *DMRT1*-Gens. Über den verwendeten Ansatz kann daher nur die Kopienzahl des Sequenzabschnitts bestimmt werden, der auf demselben Restriktionsfragment liegt wie Exon 1. Eine Dosismessung für das komplette Gen ist mit der verwendeten Methode folglich nicht möglich. Bei Verwendung von größeren Sonden, die die vollständige Sequenz des Gens erfassen erhält man nach Hybridisierung sehr viele Banden, die einzeln gemessen werden müssen, was die Genauigkeit der Bestimmung erheblich reduziert. Diese Sonden können aufgrund von RFLPs (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen) außerdem interindividuell unterschiedliche Bandenmuster erzeugen, deren Meßergebnisse bzw. daraus ermittelte Gendosen nicht mehr verglichen werden können.

Eine indirekte Bestätigung für das Vorliegen von zwei *DMRT1*-Kopien bei den Patientinnen, kann auch aus den für 9p23-p24 ermittelten Daten für die, im Folgenden beschriebene Segregationsanalyse abgeleitet werden. In diesem, *DMRT1* einschließenden Intervall kann ein Heterozygotieverlust und somit auch die Deletion von *DMRT1* und von benachbarten Genen als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob die Vererbung des Swyer-Syndroms in der voliegenden Familie überhaupt mit einem 9p-gebundenen Erbgang kompatibel ist, wurde eine Segregationsanalyse mit polymorphen Markern aus 9p23-p24 durchgeführt.

Die drei untersuchten Schwestern weisen im untersuchten Intervall unterschiedliche mütterliche Haplotypen auf. Dadurch kann ausgeschlossen werden, daß ein von der Mutter vererbter dominanter Faktor voliegt, der ausschließlich Störungen bei der Testisdeterminierung verursacht und daher im weiblichen Geschlecht keine Ausprägung zeigt.

Im distalen Abschnitt des untersuchten Intervalls besitzen alle drei Schwestern denselben paternalen Haplotyp. Somit besteht die Möglichkeit, daß die Schwestern ein in diesem Intervall lokalisiertes, die Krankheit verursachendes dominantes Allel vom Vater geerbt haben. Da der Vater jedoch gesund ist, müßte man in diesem Fall von unvollständiger Penetranz für die das Swyer-Syndrom auslösende Mutation ausgehen. Auch das Vorliegen eines Keimbahnmosaiks beim Vater wäre eine mögliche Erklärung. Als Beispiel dafür, daß Keimbahnmutationen eine relevante Rolle für das Auftreten von familiären Krankheiten spielen können, kann das Retinoblastom angeführt werden (OMIM #180200). Das Retinoblastom zeigt eine Inzidenz von ca. 1 / 23000, 20 - 30% der Fälle werden durch Keimbahnmutationen verursacht.

Berücksichtigt man die Möglichkeit einer maternalen Keimbahnumutation bei LC, so muß auch ein rezessiver Erbgang in Betracht gezogen werden.

In dem auf 9p ermittelten 13 - 15 Mbp umfassenden Intervall, in dem alle drei Schwestern denselben paternalen Haplotyp besitzen ist auch das *DMRT1*-Gen lokalisiert. In einer Studie mit 87 Patienten mit XY-Geschlechtsumkehr konnten keine Mutationen in *DMRT1* nachgewiesen werden (Raymond et al. 1999a). Dies könnnte darauf hindeuten, daß diese entweder als Ursache für die Krankheitsentstehung keine, oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Eine Deletion von *DMRT1* konnte bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientinnen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Allerdings besteht auch hier die Möglichkeit, daß ein Dosiseffekt auf Expressionsebene, in diesem Fall durch Verringerung der Expression, das Krankheitsbild verursacht. Dieser Effekt könnte durch eine Mutation in regulatorischen Sequenzabschnitten hervorgerufen werden. Bei den bisher untersuchten Patientinnen mit Swyer-Syndrom wurden nur kodierende Abschnitte und Exon-Intron-Übergänge sequenziert (Raymond et al. 1999a). Ein Ausschluß von Mutationen in möglicherweise proximal oder distal der kodierenden Sequenz lokalisierten regulatorischen Bereichen ist anhand dieser Untersuchungen nicht möglich. Gezielte Unter-

suchungen des *DMRT1*-Promotors bei den Patienten sind derzeit noch nicht durchführbar, da noch keine Informationen über 5’ oder 3’ der kodierenden Sequenz gelegene regulatorische Elemente vorliegen.

Es muß davon ausgegangen werden, daß eine Reihe weiterer, an der Geschlechtsdeterminierung beteiligter Gene noch nicht bekannt sind und somit auch nicht direkt untersucht werden können.
Aufgrund der geringen Familiengröße ist in der vorliegenden Familie keine genomweite Kopplungsanalyse zur Identifikation des hier für das Swyer-Syndrom verantwortlichen Locus durchführbar. Es konnten daher nur gezielt Segregationsanalysen für bereits bekannte Kandidatengene, oder -regionen durchgeführt werden. Mögliche Ergebnisse einer solchen Untersuchung sind einerseits ein Ausschluß des Gens bzw. der Region als Ursache für die Krankheit, oder der Nachweis von Cosegregation eines Haplotyps mit der Krankheit in der jeweils untersuchten Familie. Im letzten Fall sind weitere Analysen nur durch direkte Untersuchungen des eingegrenzten Intervalls oder eines Kandidatengens möglich.
In der vorliegenden Familie wurden mit den durchgeführten Untersuchungen die häufigsten bekannten Mutationen, die ein Swyer-Syndrom verursachen können, nämlich Mutationen in der kodierenden Sequenz des *SRY*-Gens und Deletionen des kurzen Arms von Chromosom 9 mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Die Hypothese einer Mikroduplikation von *DAX1* konnte nicht bestätigt werden.

Es können drei Mechanismen, die hier für die Entstehung der Geschlechtsumkehr verantwortlich sein könnten postuliert werden. Neben der rezessiven Vererbung eines *DMRT1*-Defekts, die nur unter Annahme einer maternalen Keimbahnmutation bei LC möglich wäre, könnte eine vom Vater übertragene dominante *DMRT1*-Mutation zum Auftreten des Swyer-Syndroms bei den Töchtern geführt haben. Allerdings müßte man hierbei verminderte Penetranz oder das Vorliegen eines Keimbahnmosaiks beim Vater voraussetzen, das von allen drei Schwestern geerbt wurde.
Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß die betroffenen Töchter von der Mutter ein mutiertes *DAX1*-Allel geerbt haben, das durch eine erhöhte Expression, bei

männlichem Karyotyp eine XY-Geschlechtsumkehr auslöst. Diese Hypothese würde nicht nur eine Erklärung für das familiäre Auftreten des Swyer-Syndroms in der untersuchten Familie liefern, sondern zusätzlich ein Modell für die mehrfach postulierte X-chromosomal vererbte Form des Swyer-Syndroms darstellen.

4.2 Ellobius lutescens

Ellobius lutescens ist ein im Iran und in Armenien lebendes Nagetier aus der Familie der *Arvicolidae*. Ein besonderes Kennzeichen dieser Spezies ist das Fehlen eines Y-Chromosoms. Beide Geschlechter besitzen denselben Karyotyp 2n=17,X (Matthey 1953) und weder mit cytogenetischen, noch mit molekulargenetischen Methoden konnten bislang geschlechtsspezifische Unterschiede identifiziert werden. Auch das Fehlen von *SRY* wurde inzwischen nachgewiesen (Just et al. 1995). Somit stellt sich die Frage nach einem alternativen Mechanismus, der bei *Ellobius lutescens* die Testisdeterminierung initiiert. Diese Funktion muß durch ein anderes, vermutlich normalerweise *SRY*-nachgeschaltetes Gen übernommen worden sein.

Beim Menschen tritt eine XX-Geschlechtsumkehr mit einer Inzidenz von 1 / 20000 auf (De la Chapelle 1981). 90% der Patienten besitzen ein *SRY*-Gen, das durch ein fehlerhaftes Crossover in der väterlichen Meiose auf das X-Chromosom übertragen wurde. Nur bei 10% der Fälle liegt kein *SRY* vor (Numabe et al. 1992, Fechner et al. 1993). Für Untersuchungen zur Aufklärung dieser Form der XX-Geschlechtsumkehr stehen demnach sehr wenige Patienten zur Verfügung. Familiäre Fälle, die für Segregationsanalysen geeignet wären, treten dementsprechend noch seltener auf.

Möglicherweise stellt *Ellobius lutescens* ein Modell für diese beim Menschen auftretende XX-Geschlechtsumkehr in Abwesenheit von *SRY* dar, sodaß die bei dieser Spezies durchgeführten Studien, neben neuen Erkenntissen über die Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere allgemein, auch Erklärungen für die Entstehung der XX-Geschlechtsumkehr beim Menschen liefern können.

Für die Suche nach dem testisdeterminierenden Gen bei *Ellobius lutescens* stehen verschiedene Ansätze zur Verfügung. Neben der sehr aufwendigen genomweiten Suche nach geschlechtsspezifischen Unterschieden, erscheint die

Überprüfung einer möglichen testisdeterminierenden Funktion der Gene sinnvoll, deren Beteiligung an der Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere bereits bekannt ist. Dieser Ansatz basiert auf der Hypothese, daß bei einem dieser Gene ein mutiertes Allel vorliegen könnte, das entweder zu einer Initiation oder einer Hemmung der Testisentwicklung führt. Im ersten Fall würde das männliche Geschlecht dominant vererbt werden, im zweiten Fall rezessiv. Bei einem dominanten Erbgang für das männliche Geschlecht würde die Vererbung des weiblichen Geschlechts nach einem rezessiven Modus erfolgen, während bei rezessiver Vererbung des männlichen Geschlechts ein dominanter Erbgang des weiblichen Geschlechts vorliegen würde. Eine mögliche X-chromosomale Vererbung des Geschlechts stellt hierbei eine Ausnahme dar. Aufgrund der Hemizygotie des X-Chromosoms bei *Ellobius lutescens* muß nicht zwischen dominantem und rezessivem Erbgang unterschieden werden, da der Phänotyp nur von dem einzigen jeweils vorliegenden Allel abhängen würde.

Sox9, *Dmrt1* und *Dax1* stellen Kandidatengene für eine, die Testisentwicklung initiierende Funktion bei *Ellobius lutescens* dar. Zur Überprüfung der zugrundeliegenden Hypothesen sollte in der voliegenden Arbeit die Geschlechtsspezifität von möglichen Allelen dieser Gene bei *Ellobius lutescens* untersucht werden. Da nicht bekannt ist, ob solche Allele tatsächlich existieren, und worin sie sich unterscheiden könnten, ist eine direkte Untersuchung nicht möglich. Ein geeigneter Ansatz ist die indirekte Analyse durch polymorphe Marker, die innerhalb, oder in benachbarten Sequenzen der zu untersuchenden Gene liegen, sodaß eine Kopplung zwischen Gen und Marker angenommen werden kann. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man im Voraus keine Information über den vorliegenden Funktionsmechanismus des fraglichen Gens, bzw. über den vorliegenden Vererbungsmodus benötigt. Voraussetzung ist allerdings, daß eine ausreichende Anzahl von Individuen, möglichst in Form von Familien, für die Untersuchung zur Verfügung stehen, sodaß eine statistisch signifikante Aussage, z. B. durch die Berechnung von Lod Scores getroffen werden kann.

4.2.1 Ausschluß einer testisdeterminierenden Funktion von Sox9 bei Ellobius lutescens durch Kopplungsanalyse

SOX9 ist derzeit das einzige an der Geschlechtsdeterminierung beteiligte Gen für das Mutationen bekannt sind, die zur XX-Geschlechtsumkehr führen können. Befunde bei Mensch und Maus deuten darauf hin, daß eine erhöhte SOX9-Dosis, die entweder durch Erhöhung der Anzahl vorliegender Genkopien, oder durch eine vermehrte Expression hervorgerufen werden kann, in Abwesenheit von *SRY* eine männliche Entwicklung induziert (Overbeek et al. 1999, Huang et al. 1999).
Um zu überprüfen, ob *Sox9* bei *Ellobius lutescens* für die Induktion der Testisentwicklung verantwortlich sein könnte, wurde eine Segregationsanalyse mit einem in Intron 2 des Gens lokalisierten biallelischen Marker durchgeführt. Der verwendete Marker war zuvor in der untersuchten Familie über eine EMD-Analyse identifiziert worden. Es wurde ermittelt, daß die Markerallele in der Familie unabhängig vom Geschlecht segregieren. Da der Marker in einem Intron des *Sox9*-Gens lokalisiert ist, kann eine Kopplung zwischen Marker und Gen vorausgesetzt werden, und somit kann von einer geschlechtsunabhängigen Segregation der Marker-Allele auf eine geschlechtsunabhängige Segregation von *Sox9*-Allelen geschlossen werden.
Diese Befunde konnten durch die Berechnung von Two Point-Lod Scores formal belegt und präzisiert werden. Für einen angenommenen dominanten Erbgang wurde bei einer Rekombinationshäufigkeit unter 0,05 ein Lod Score ermittelt, der kleiner als -2 ist und somit das entsprechende Intervall als Kandidatenregion ausschließt. Bei einer rezessiven Vererbung liegt der Lod Score sogar bei einer Rekombinationshäufigkeit von bis zu 0,18 unter -2. Eine Rekombinationsfrequenz von 0,01 entspricht 1 cM, und somit einem physikalischen Abstand von ca. 1 Mbp. Damit können Gene, die im Abstand von weniger als 5 bzw. 18 Mpb vom getesteten Marker liegen als Kandidatengene für die Testisdeterminiinierung bei *Ellobius lutescens* ausgeschlossen werden. Für das *SOX9*-Gen wird bei Mensch und Maus die Existenz von regulatorischen Elementen im Abstand von bis zu etwa 1 Mbp 5’ der kodierenden Sequenz angenommen. Dies wird daraus abgeleitet, daß beim Menschen Translokationsbruchpunkte in dieser Entfernung von *SOX9* zur Kampomelen Dysplasie führen können (Pfeifer et al. 1999). Bei der Maus weist die Geschlechtsumkehr der *Odsex*-Mäuse durch Insertion eines Transgens ca. 1 Mbp 5’ der kodierenden Sequenz ebenfalls auf die Existenz

regulatorischer Elemente in diesem Abschnitt hin (Overbeek et al. 1999). Selbst wenn ein möglicher geschlechtsspezifischer Unterschied zwischen *Sox9*-Allelen bei *Ellobius lutescens* in solchen entfernten Elementen vorliegen würde, könnte das Gen aufgrund der ermittelten Daten mit Sicherheit als Kandidatengen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Dmrt1-Allele treten bei Ellobius lutescens nicht geschlechtsspezifisch auf und können daher keine testsideterminierende Funktion besitzen

Das *DMRT1*-Gen wurde aufgrund seiner Homologie zu den bei *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* geschlechtsspezifisch exprimierten Genen *dsx* und *mab-3* entdeckt (Raymond et al. 1998). Bei Mensch, Maus und auch beim Huhn wird *DMRT1* ausschließlich im Testis exprimiert (Raymond et al. 1999b, Smith et al. 1999, Moniot et al. 2000). Die Expression beginnt in der männlichen Gonadenanlage, bevor die ersten Differenzierungsschritte erkennbar sind, was eine Funktion bei der Testisdeterminierung impliziert.

Vögel besitzten kein *SRY*-Gen und der hier für die Initiation der Testisdeterminierung verantwortliche Faktor ist bislang noch nicht bekannt (Coriat et al. 1993, McBride et al. 1997). Das *Dmrt1*-Gen der Vögel ist auf dem Z-Chromosom lokalisiert (Nanda et al. 1999). Da bei männlichen Tieren zwei Z-Chromosomen vorliegen (ZZ), bei weiblichen jedoch nur eines (ZW) wird spekuliert, daß *Dmrt1* bei den Vögeln die Testisdeterminierung durch einen dosisabhängigen Mechanismus initiieren könnte, wobei eine zweifache Dosis die männliche und eine einfache Dosis die weibliche Entwicklung bewirkt. Da bei *Ellobius lutescens* ebenfalls kein *SRY*-Gen vorliegt, könnte hier dieselbe Hypothese aufgestellt werden, mit dem Unterschied, daß eine Differenz in der *Dmrt1*-Dosis zwischen den Geschlechtern nicht durch unterschiedliche Chromosomensätze verursacht werden kann.

Eine Kandidatenregion für das testisdeterminierende Gen liegt bei *Ellobius lutescens* auf Chromosom 1. Dies wurde aus dem geschlechtsspezifischen Auftreten von Strukturvarianten des Chromosoms geschlossen (De La Maza and Sawyer 1976, Wolf et al. 1979). Hierbei handelt es sich um einen Polymorphismus im proximalen Abschnitt des langen Chromosomenarms. Allerdings wurde in Studien, die in zwei unterschiedlichen Populationen durchgeführt wurden gezeigt,

daß dieselben Varianten einmal mit dem männlichen und einmal mit dem weiblichen Geschlecht auftraten (Djalali et al. 1986). Daraus wurde abgeleitet, daß zwar kein kausaler Zusammenhang zwischen der Strukturvariante und einer männlichen oder weiblichen Entwicklung bestehen kann, aber daß Polymorphismus und testisdeterminierendes Gen möglicherweise auf dem proximalen langen Arm von Chromosom 1 gekoppelt vorliegen. Die Lokalisation von *Dmrt1* in dieser Region würde einen zusätzlichen Hinweis für eine testisdeterminierende Funktion des Gens bei *Ellobius lutescens* liefern.

In der vorliegenden Arbeit konnte *Dmrt1* bei *Ellobius lutescens* durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 lokalisiert werden. Es liegt hier allerdings im telomernahen Bereich, sodaß eine Kopplung zur proximalen Region des langen Arms nicht angenommen werden kann. Aus der Lokalisation kann demnach keine Evidenz für eine testisdeterminierende Funktion von *Dmrt1* bei *Ellobius lutescens* abgeleitet werden.

Zum Überprüfen der Geschlechtsspezifität von *Dmrt1*-Allelen durch eine Segregationsanalyse mit dem isolierten Marker eDMT1.1 stand keine geeignete *Ellobius lutescens* Familie für zur Verfügung. Für diesen Marker wurden nur bei Tieren aus dem Iran unterschiedliche Allele identifiziert, während alle untersuchten Tiere aus der armenischen Population dasselbe Allel aufwiesen. Unterschiede bezüglich der Allelfrequenzen von SNPs (Single-nucleotide polymorphisms) sind auch beim Menschen ein Kennzeichen unterschiedlicher Populationen und bestätigen somit indirekt die Annahme, daß hier tatsächlich getrennte *Ellobius lutescens*-Populationen vorliegen (Goddard et al. 2000).

Das mögliche geschlechtsspezifische Auftreten von Allelen des Markers eDMT1.1 wurde bei 23 nicht-verwandten Tieren aus einer iranischen Population überprüft. Dabei konnte keine Assoziation zwischen bestimmten Marker-Allelen und dem Geschlecht nachgewiesen werden. Unter der Annahme von Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Marker eDMT1.1 und dem Gen *Dmrt1* bedeutet dies einen Ausschluß von *Dmrt1* als testisdeterminierender Faktor bei *Ellobius lutescens*.

Unter Kopplungsungleichgewicht versteht man die Assoziation von bestimmten Allelen unterschiedlicher Marker bzw. Phänotypen in einer Population. Der Nachweis eines Kopplungsungleichgewichts im Bereich des *Dmrt1*-Gens ist bei *Ellobius lutescens* derzeit nicht möglich, da die hierzu mehrere polymorphe

Marker aus der Umgebung des Gens analysiert werden müßten. Solche Marker stehen jedoch momentan noch nicht zur Verfügung.

Es existieren allerdings mehrere Gründe, die die Annahme eines Kopplungsungleichgewichts unter den gegebenen Bedingungen rechtfertigen.

Es sind unterschiedliche Mechanismen denkbar, die solche Assoziationen hervorrufen können. In vielen Fällen ist die Ursache für das Auftreten des Kopplungsungleichgewichts jedoch noch unklar.

Ein möglicher Faktor, der das Entstehen von Kopplungsungleichgewicht begünstigt ist eine enge Kopplung zwischen den betreffenden Loci. Die damit verbundene sehr geringe Rekombinationsfrequenz bewirkt, daß die Zeitdauer bis zum Einstellen des Kopplungsgleichgewichts sehr lang, und das Gleichgewicht somit eventuell noch nicht erreicht ist. Der getestete Marker eDMT1.1 liegt im Intron 2 des *Dmrt1*-Gens, also innerhalb des Gens, was für eine enge Kopplung der beiden Loci spricht. Die Größe des *Dmrt1*-Gens ist bei *Ellobius lutescens* nicht bekannt. Allerdings sind die kodierenden Sequenzen, sowie die Positionen der Introns bei den bisher untersuchten Spezies konserviert. Bei der Maus scheinen zumindest einige der Introns eine ähnliche Größe aufzuweisen wie die humanen *DMRT1*-Introns (D. Zarkower, persönliche Mitteilung). Das humane *DMRT1*-Gen umfaßt auf genomischer Ebene ca. 130 kb, und aufgrund der angenommenen hohen Konservierung des Gens muß bei *Ellobius lutescens* von einer vergleichbaren Größe ausgegangen werden. Da nicht bekannt ist, in welchem Abschnitt des Gens ein möglicher geschlechtsspezifischer Unterschied lokalisiert sein könnte, müßte sich das postulierte Kopplungsungleichgewicht auf ein Intervall erstrecken, das mindestens diese 130 kb einschließt, um eine Assoziation von Marker-Allelen und *Dmrt1*-Allelen voraussetzen zu können. Für den Fall, daß regulatorische Elemente existieren, die wie bei *SOX9* in einem größeren Abstand von der kodierenden Sequenz liegen, sollte dieses Intervall noch größer sein.

Für die Einstellung des Kopplungsgleichgewichts spielt neben dem genetischen Abstand die Anzahl der zwischen Marker- und Gen-Locus eintretender Rekombinationsereignisse eine entscheidende Rolle. Diese hängt wiederum von der Anzahl der Generationen, bzw. der Meiosen ab, die zwischen dem Auftreten der Mutation, die eine testisdeterminierende Funktion des betreffenden Gens ermöglicht hat und dem Zeitpunkt der Untersuchung liegen.

Über das Alter der Spezies *Ellobius lutescens* liegen keine Daten vor. Zur groben Abschätzung des Speziationszeitpunktes können lediglich Daten verwandter Spezies herangezogen werden. Phylogenetische Studien anhand von mitochondrialen DNA-Sequenzen datieren die Ausbreitung der *Arvicolidae* auf eine Zeitpunkt vor ca. 3 - 5 Millionen Jahren, und die Auftrennung einzelner Spezies innerhalb der Ordnungen liegt diesen Untersuchungen zufolge ca. 2 Millionen Jahre zurück (Conroy und Cook 1999). Analysen von Proteinpolymorphismen datierten die Speziation innerhalb der Gattung *Ellobius* sogar noch später (Mezhzherin et al. 1995). Da *Ellobius lutescens* mit großer Wahrscheinlichkeit erst durch Verlust eines X-Chromosoms aus einer der *Ellobius*-Spezies hervorgegangen ist, die in beiden Geschlechtern zwei X-Chromosomen besitzen, könnte diese Speziation sogar noch deutlich später erfolgt sein, als die der anderen Mitglieder der Gattung. Es ist allerdings noch unklar, in welcher Reihenfolge die Speziationen innerhalb der Gattung *Ellobius* abgelaufen sind, bzw. aus welcher der anderen Arten *Ellobius lutescens* hervorgegangen ist. Daher kann auch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß sich *Ellobius lutescens* unabhängig von den anderen *Ellobius*-Spezies entwickelt hat. Demzufolge ist nicht exakt genug festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die Mutation, die eine Geschlechtsdeterminierung unabhängig von *SRY* ermöglicht hat, aufgetreten ist.

Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichts, das sich aufgrund einer entwicklungsgeschichtlich späten Speziation über ein größeres Intervall erstreckt, ist aus diesen Daten daher nicht abzuleiten. Sie stehen jedoch andererseits auch nicht im Widerspruch zu der Annahme eines Kopplungsungleichgewichts, das sich über einen *Dmrt1*-einschließenden Abschnitt von ca. 130 kbp erstreckt, da Kopplungsungleichgewichte dieser Größenordnung häufiger beobachtet werden. Die Annahme von Kopplungsungleichgewicht als Grundlage für einen Ausschluß von *Dmrt1* als Kandidatengen für die Testisdeterminierung bei *Ellobius lutescens* ist daher gerechtfertigt.

Auch die Substrukturierung der Population hat einen großen Einfluß auf die Entstehung von Kopplungsungleichgewicht. Die meisten Untersuchungen von Kopplungsungleichgewichten wurden bisher in humanen Populationen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, daß der Umfang des Kopplungsungleichgewichts von der Geschichte der Population, aus der die Probanden stammten abhängt (Kruglyak 1999, Zöllner und von Haeseler 2000). Demographische

Faktoren, die die Einstellung des Kopplungsgleichgewichts verhindern können sind die Bildung von Hybridpopulationen, aber auch das Auftreten von isolierten Populationen wie beispielsweise den Ashkenazi-Juden oder den Finnen. Hier erstreckt sich das Kopplungsungleichgewicht oft über Abschnitte von mehreren Mpb, während in anderen Populationen unter Umständen nur wenige kbp erreicht werden (Wilson und Goldstein, 2000, Kruglyak 1999).

Über die Populationsstruktur der Spezies *Ellobius lutescens* liegen keine Informationen vor. Allerdings werden bei den meisten *Microtinae* starke Schwankungen der Bestandsdichte beobachtet, was zu ähnlichen Effekten führen könnte wie die Ausbildung von isolierten Populationen bzw. Hybridpopulationen beim Menschen.

Eine Bestätigung für eine solche Annahme könnte die geringe Inzidenz von Polymorphismen sein, wie sie in dieser und in früheren Arbeiten beobachtet wurde (Vogel et al. 1998).

Die Annahme eines Kopplungsungleichgewichts, das sich über einen, das *Dmrt1*-Gen einschließenden Sequenzabschnitt erstreckt, erscheint berechtigt. Gründe hierfür sind einerseits die enge Kopplung zwischen *Dmrt1*-Gen und Marker eDMT1.1, sowie die aus der angenommenen Populationsstruktur abgeleiteten Effekte, die die Einstellung des Kopplungsgleichgewichts verzögern.

Somit kann für die Interpretation der ermittelten Ergebnisse eine Assoziation zwischen Allelen des Markers eDMT1.1 und Allelen des *Dmrt1*-Gens angenommen werden. Da keine Assoziation von Geschlecht und eDMT1.1-Allelen nachgewiesen werden konnte, kann eine Geschlechtsspezifität von *Dmrt1*-Allelen und damit eine testisinduzierende Funktion von *Dmrt1* ebenfalls ausgeschlossen werden.

4.2.3 Suche nach polymorphen Markern zur Überprüfung eines möglichen geschlechtsspezifischen Auftretens von Dax1-Allelen bzw. X-Chromosomen

Das *DAX1*-Gen übt bei der Geschlechtsdeterminierung von Mensch und Maus eine dosisabhängige antagonistische Funktion zu *SRY* aus und kann dadurch in Abhängigkeit von der Anzahl vorhandener Genkopien eine XY-Geschlechtsumkehr hervorrufen (Swain et al. 1998). Die Beteiligung von *DAX1* bei der Entstehung von XX-Geschlechtsumkehr wurde bisher noch nicht beschrieben. Es wäre jedoch denkbar, daß bei *Ellobius lutescens* zwei unterschiedliche *Dax1*-Allele

vorliegen: ein ‘normales’ Allel, das eine hemmende Wirkung auf die Testisentwicklung besitzt und somit zur weiblichen Entwicklung führt und ein mutiertes Allel, das diese hemmende Wirkung verloren hat und dadurch eine männliche Entwicklung ermöglicht.

Da bei *Ellobius lutescens* in beiden Geschlechtern nur ein X-Chromosom vorhanden ist, kann keine meiotische Rekombination auftreten. Dies bedeutet jedoch, daß zur Untersuchung der Segregation des gesamten X-Chromosoms in einer beliebigen Familie theoretisch die Analyse eines einzigen Markers ausreicht.

Bei allen bislang untersuchten Eutheria ist *DAX1* auf dem X-Chromosom lokalisiert. Aufgrund der ungewöhlichen Chromosomenkonstellation bei *Ellobius lutescens* wurde die X-chromosomale Lokalisation von *Dax1* duch FISH bestätigt, um sicherzustellen, daß eventuell für die Region um *Dax1* ermittelte Aussagen für das gesamte X-Chromosom Gültigkeit besitzen könnten.

Schon in vorangegangenen Studien wurde versucht, einen X-chromosomalen polymorphen Marker für einen solchen Ansatz zu definieren (Vogel et al. 1998). Dazu wurden zwei bei der Maus hoch polymorphe X-chromosomale (CA)-Repeat-Marker bei *Ellobius lutescens*, *Ellobius tancrei* und *Ellobius fuscocapillus* getestet. Bei *E. fuscocapillus* liegt die übliche Gonosomenkonstitution XX/XY vor. Die getesteten Marker waren hier wie erwartet polymorph. Bei *E. tancrei*, wo beide Geschlechter je zwei X-Chromosomen besitzen, wurden bei verschiedenen Tieren unterschiedliche Allele gefunden. Diese lagen jedoch immer homozygot vor. Bei *E. lutescens* wurden keine unterschiedlichen Allele gefunden. Alle untersuchten Tiere zeigten dieselbe Fragmentgröße.

Aufgrund dieser Vorbefunde wurde in der vorliegenden Arbeit gezielt nach Einzelbasen-Austauschen (Single-nucleotide polymorphisms = SNPs) als Marker für eine Segregationsanalyse gesucht. Diese besitzen, wie beim Menschen gezeigt wurde, eine wesentlich höhere Inzidenz als (CA)-Repeats, ca. 1 / 500 - 1000 bp im Vergleich zu ca. 1 / 30000 bp und sind im Gegensatz zu (CA)-Repeats - per Definition - polymorph (Wang et al. 1998, Sherry et al. 1999, Beckman und Weber 1992).

Es wurden sechs *Ellobius lutescens*-Individuen gegeneinander getestet. Darunter zwei aus der iranischen und vier aus der armenischen Population. Innerhalb der Populationen wurden dabei keine Sequenzunterschiede detektiert und auch zwischen den beiden Populationen wurde lediglich ein Polymorphismus gefunden.

Bei *Ellobius lutescens* ist die Häufigkeit von SNPs nicht bekannt. Geht man von der beim Menschen ermittelten Inzidenz von einem SNP pro 500 - 1000 bp aus (Sherry et al. 1999), so würde man auf dem bei sechs Tieren analysierten Sequenzabschnitt von ca. 5 kbp theoretisch mit fünf bis zehn Sequenzunterschieden rechnen. Die Sensitivität des verwendeten EMD-Tests wird mit 100% angegeben (Del Tito et al. 1998). Daher sind technische Probleme bei der Detektion vorhandener Polymorphismen auszuschließen, sodaß tatsächlich von einer vergleichsweise geringen Inzidenz der SNPs bei *Ellobius lutescens* auszugehen ist.
Die beabsichtigte Untersuchung einer möglichen testisdeterminierenden Funktion von *Dax1* bzw. eines X-chromosomalen Mechanismus der Testisdeterminierung bei *Ellobius lutescens* durch eine Segregationsanalyse konnte nicht durchgeführt werden, da im Rahmen dieser Arbeit kein innerhalb einer Familie polymorpher X-chromosomaler Marker identifiziert werden konnte.
Diese nun schon zum zweiten Mal beobachtete, geringe Inzidenz von Polymorphismen innerhalb von *Ellobius lutescens*-Populationen kann möglicherweise wiederum auf Populationsstrukturen innerhalb dieser Spezies zurückgeführt werden. Wie bereits oben beschrieben, kann man davon ausgehen, daß hier mehr oder weniger isolierte Populationen vorliegen, in denen Gründer-Effekte eine große Rolle spielen.

Die Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere läuft nach einem kaskadenartigen, bzw. nach neueren Hypothesen netzwerkartigen Prinzip ab (McElreavey et al. 1993, Koopman 1999). In jedem Fall liegt ein hierarchisches Modell zugrunde, in dem einige Gene früher, andere später aktiviert werden. Bei Patienten mit Störungen der Geschlechtsdeterminierung treten häufig Phänotypen auf, die einer unvollständigen Geschlechtsumkehr entsprechen. Dies legt die Vermutung nahe, daß nur Mutationen in einem geringen Teil dieser Gene eine vollständige Geschlechtsumkehr hervorrufen können. Hierbei dürfte es sich um die Gene handeln, die am Anfang der postulierten Kaskade stehen und zu einem Zeitpunkt exprimiert werden, an dem noch sowohl eine vollständige männliche als auch eine vollständige weibliche Entwicklung stattfinden kann. Diese Gene können auch als Kandidatengene für die Testisdeterminierung bei *Ellobius lutescens* angesehen

werden. Von den bislang identifizierten Genen sind dies *SRY*, *SOX9*, *DMRT1* und *DAX1*.

Nachdem das Fehlen von *SRY* bei *Ellobius lutescens* schon seit längerem bekannt ist, konnten in der vorliegenden Arbeit mit *Sox9* und *Dmrt1* zwei der drei noch bekannten möglichen Kandidatengene für die Testisdeterminierung ausgeschlossen werden.
Die Evidenz für eine testisdeterminierende Funktion von *Dax1* ist im Vergleich zu der der Gene *Sox9* und *Dmrt1* relativ gering, da keine direkten Hinweise für eine Beteiligung von *DAX1* an der Testisinduktion in Abwesenheit von *SRY* vorliegen. Somit muß die Existenz eines weiteren, noch unbekannten Gens angenommen werden, das eine zentrale Rolle bei der Geschlechtsdeterminierung der Säuger, möglicherweise sogar aller Vertebraten spielen dürfte.

4.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weder die Ursache für die XY-Geschlechtsumkehr bei den Patientinnen mit Swyer-Syndrom, noch der Mechanismus der Testisdeterminierung in Abwesenheit von *Sry* bei *Ellobius lutescens* aufgeklärt werden. Für eine Weiterführung der Untersuchungen können verschiedene Ansätze in Betracht gezogen werden, von denen einige im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Swyer-Syndrom

In der untersuchten Familie wurden als mögliche Ursachen für das Swyer-Syndrom Mutationen in regulatorischen Sequenzabschnitten außerhalb des *DAX1*- bzw. *DMRT1*-Gens postuliert, die die Höhe der Expression verändern. Wie bereits erwähnt könnten diese Hypothesen durch Expressionsstudien überprüft werden. Dazu müßten die entsprechenden Sequenzen in einen Expressionsvektor kloniert und in einem geeigneten Zellsystem oder transgenen Mausmodell getestet werden. Hierfür werden jedoch Informationen über die Lokalisation relevanter regulatorischer Abschnitte benötigt, die momentan noch nicht vorliegen. Sobald die Sequenzen regulatorischer Elemente veröffentlicht werden, ist auch eine

Überprüfung der aufgestellten Hypothese durch Sequenzierung der entsprechenden Bereiche bei den Patienten möglich.

Ellobius lutescens

Bei *Ellobius lutescens* wurden die zwei zur Zeit wichtigsten Kandidatengene für eine Testisdeterminierung unabhängig von *Sry*, *Sox9* und *Dmrt1* ausgeschlossen. Da kein polymorpher Marker für die Untersuchung des *Dax1*-Gens identifiziert wurde, konnten weder die mögliche testisdeterminierende Funktion von *Dax1*, noch ein X-chromosomaler Mechanismus generell überprüft werden. Für eine Weiterführung dieses Ansatzes stehen jedoch neben der aufwendigen Suche nach polymorphen Markern derzeit keine alternativen Methoden zur Verfügung.
Als nächstes Projekt ist die Untersuchung des Gens, das bei Ziegen für das Polled-Intersex-Syndrom (PIS) verantwortlich ist geplant. Mutationen dieses Gens führen bei der Ziege zur XX-Geschlechtsumkehr. Die Kandidatenregion ist bis auf 100 kbp eingegrenzt (Schibler et al. 2000), sodaß das Gen in Kürze bekannt sein dürfte. Die Möglichkeit einer testisdeterminierenden Funktion bei *Ellobius lutescens* soll hier wiederum durch Segregationsanalyse überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Die Geschlechtsdeterminierung der Säugetiere läuft nach einem komplexen, kaskaden- oder netzwerkartigen Mechanismus ab, der bislang noch weitgehend unbekannt ist. Einige der beteiligten Gene sind bereits identifiziert, aber man geht davon aus, daß eine Reihe weiterer Gene eine Rolle bei der Geschlechtsdeterminierung spielen müssen. Die meisten neuen Erkenntisse auf diesem Gebiet werden durch molekulargenetische Untersuchungen von Patienten mit Geschlechtsumkehr, bzw. von Tiermodellen mit Abweichungen von der beim Säuger üblichen Gonosomenkonstitution XX/XY gewonnen.

Patientinnen mit Swyer-Syndrom besitzen einen männlichen Karyotyp 46,XY, sind aber mit Ausnahme von Stranggonaden phänotypisch unauffällig weiblich. In der vorliegenden Arbeit konnten anhand einer Familie mit drei betroffenen Töchtern bekannte und postulierte Krankheitsursachen ausgeschlossen werden, wie Mutationen in der kodierenden Sequenz des *SRY*-Gens, Deletionen von 9p23-p24, sowie Mikroduplikationen von *DAX1* und *DMRT1*-Deletionen. Es konnten drei denkbare Mechanismen für die Entstehung der XY-Gonadendysgenesie aus den ermittelten Ergebnissen abgeleitet werden. Einerseits könnte eine maternal vererbte, die Expression des *DAX1*-Gens steigernde Promotormutation vorliegen. Andererseits könnte das Swyer-Syndrom durch eine paternale Keimbahnmutation verursacht werden, die die Expression des *DMRT1*-Gens vermindert. Als dritte Möglichkeit wäre ein rezessiv vererbter Defekt des *DMRT1*-Gens denkbar. Dabei müßte jedoch eine maternale Keimbahnmutation bei LC angenommen werden.

Bei *Ellobius lutescens* liegt in beiden Geschlechtern der Karyotyp 17,X vor. Da diese Tiere kein *Sry*-Gen besitzen, muß ein anderers Gen die testisdeterminierende Funktion im männlichen Geschlecht übernommen haben. Zwei mögliche Kandidatengene hierfür, *Sox9* und *Dmrt1* konnten in dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Die Untersuchung einer testisdeterminierenden Funktion des X-chromosomalen *Dax1*-Gens, bzw. eines X-chromosomalen Mechanismus der Geschlechtsdeterminierung konnte nicht durchgeführt werden, da auf dem zur Definition eines Markers analysierten Sequenzabschnitt kein geeigneter Polymorphismus identifiziert werden konnten. Der Ausschluß der Kandidatengene *Sox9* und *Dmrt1* bei *Ellobius lutescens* liefert indirekte Evidenz für die Existenz mindestens eines weiteren testisdeterminierenden Gens bei den Säugetieren.

.

6 Literaturverzeichnis

Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ERB, Fraccaro M, Zuffardi O, Camerino G: A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal.
Nature Genet 7: 497-501 (1994)

Beckman JS, Weber JL: Survey of human and rat microsatellites.
Genomics 12: 627-631 (1992)

Behlke MA, Bogan JS, Beer-Romero P, Page DC: Evidence that the SRY protein is encoded by a single exon on the human Y chromosome.
Genomics 17: 736-739 (1993)

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

Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res 7: 1513-1521 (1979)

Capel B, Rasberry C, Dyson J, Bishop CE, Simpson E, Vivian N, Lovell-Badge R, Rastan S, Cattanach BM: Deletion of Y chromosome sequences located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal.
Nature Genet 5: 301-307 (1993)

Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM,Cheung A, Ninfa EG, Frey AZ, Gash DJ, Chow EP, Fisher RA, Bertonis JM, Torres G, Wallner BP, Ramachandran KL, Ragin RC, Manganaro TF, MacLaughlin DT, Danahoe PK: Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells.
Cell 45:685-698 (1986)

Chandra HS: Is human X chromosome inactivation a sex-determining device?
Proc Natl Acad Sci USA 82: 6947-6949 (1985)

Clepet C, Schafer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: The human *SRY* transcript.
Hum Mol Genet 2: 2007-2012 (1993)

Conroy CJ, Cook JA: MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within Arvicoline and Murid rodents.
J Mammal Evol 6:221-245 (1999)

Coriat AM, Mueller U, Harry JL, Uwanogho D, Sharpe PT: PCR amplification of *SRY*-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the HMG-box motif.
PCR Meth 2: 218-222 (1993)

De la Chapelle A: Chromosomal mosaicism, X chromosome anomaly and sex chromatin discrepancy in a case of gonadal dysgenesis.
Acta Endocrinol 39: 175 (1962)

De la Chapelle A: The etiology of maleness in XX men.
Hum Genet 58: 105-116 (1981)

De La Maza LM, Sawyer JR: The G and Q banding pattern of *Ellobius lutescens*. A unique case of sex determination in mammals.
Can J Genet Cytol 18: 497-502 JR (1976)

Del Tito BJ, Poff HE, Novotny MA, Cartledge DM, Walker II RI, Earl CE, Bailey AL: Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection.
Clin Chem 44: 731-739 (1998)

Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Barton P, Ashworth A: A conserved family of genes related to the testis determing gene *SRY*.
Nucleic Acids Res 20: 2887 (1992)

Devereux J, Haeberli P, Smithies O: A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX.
Nucleic Acids Res 12: 387-395 (1984)

Djalali M, Hameister H, Vogel W: Further chromosomal studies on *Ellobius lutescens*: hetermomophism of chromosome No. 1 is not associated with sex determination.
Experientia 42: 1281-1282 (1986)

Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB, Morrow KE: *Mus poschiavinus* Y chromosome in the *C57BL/6J* murine genome causes sex reversal.
Science 217: 535-537 (1982)

Fechner PY, Marcantonio SM, Jaswaney V, Stetten G, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD, Amrhein JA, Bard PA, Lee PA, Reid C, Tsalikian E, Urban MD: The role of the sex-determining region Y gene in the etiology of 46,XX maleness.
J Clin Endocrinol Metab 76: 690-695 (1993)

Feinberg AP, Vogelstein B: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal Biochem 132: 6-13 (1983)

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R: SRY, like HMG1 recognizes sharp angles in DNA.
EMBO J 11: 4497-4506 (1992)

Fiddler M, Abdel-Rahman B, Pappolee DA, Pergament E: Expression of *SRY* transcripts in preimplantation human embryos.
Am J Med Genet 55: 80-84 (1995)

Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JCC, Briggs JH: A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome).
Lancet I: 711-713 (1959)

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour X, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ: Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an *SRY*-related gene.
Nature 372: 522-530 (1994)

Geerkens C, Vetter U, Just W, Fedarko NS, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Gehron Robey P, Wöhrle D, Vogel W: The X-chromosomal human biglycan gene *BGN* is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene.
Hum Genet 96:44-52 (1995)

Giese K; Pagel J Grosschedl R: Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determing factors.
Proc Natl Acad Sci USA 91: 3368-3374 (1994)

Goddard KAB, Hopkins PJ, Hall JM, Witte JS: Linkage disequilibrium and allele-frequency distributions for 114 single-nucleotide polymorphisms in five population.
Am J Hum Genet 66: 216-234 (2000)

Goodfellow PN, Camerino G: *DAX-1*, an 'anti-testis' gene.
Cell Mol Life Sci 55: 857-863 (1999)

Graves JAM: The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes - and evolving understanding.
BioEssays 17: 311-321 (1995)

Grosschedl R, Giese J, Pagel J: HMG domain protiens: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures.
Trends Genet 10: 94-100 (1994)

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

Guo W, Burris TP, McCabe ERB: Expression of *DAX1*, the gene responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism, in the hypothalamic-pituitary-adrenal/gonadal axis.
Biochem Mol Med 56: 8-13 (1995)

Guo W, Burris TP, Zhang YH, Huang BL, Mason J, Copeland KC, Kupfer SR, Pagon RA, McCabe ERB: Genomic sequence of the *DAX1* gene: an orphan nuclear receptor responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism.
J Clin Endocrinol Metab 81(7): 2481-2486 (1996)

Gutierrez-Adan A, Behboodi E, Murray JD, Anderson GB: Early transcription of the *SRY* gene by bovine preimplantation embryos.
Mol Reprod Dev 48: 246-250 (1997)

Hamerton JL, Dickson JM, Pollard CE, Grieves SA, Short RV: Genetic intersexuality in goats.
J Reprod Fert 7: 25-52 (1969)

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI: *SRY*, *SOX9*, and *DAX1* expression patterns during human sex determination and gonadal development.
Mech Dev 91: 403-407 (2000)

Harley V, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovitz GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females.
Science 255: 453-456 (1992)

Harley V, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: Definition of a consensus DNA binding site for SRY.
Nucleic Acids Res 22: 1500-1501 (1994)

Harry JL, Koopman P, Brennan FE, Graves JAM, Renfree MB: Widespread expression of the testis-determining gene *SRY* in a marsupial.
Nature Genet 11: 347-349 (1995)

Hawkins J, Taylor A, Goodfellow P, Migeon C, Smith K, Berkovitz G: Evidence for increased prevalence of *SRY* mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis.
Am J Hum Genet 51: 979-984 (1992)

Honda T, Suzuki H, Itoh M: An unusual sex chromosome constitution found in the amami spinous country-rat, *Tokudaia Osimensis Osimensis*.
Jap J Genet 52: 247-249 (1977)

Hoo JJ, Salafsky IS, Lin CC, Pinsky L: Possible location of a recessive testis forming gene on 9p24.
Am J Hum Genet (Suppl) 45: A73 (1989)

Houston CS, Opitz JM, Spranger JW, Macpherson RI, Reed MH, Gilbert EF, Herrmann J, Schinzel A: The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al. in 1971.
Am J Med Genet 15: 3-28 (1983)

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J: Autosomal XX sex reversal caused by duplication of *SOX9*.
Am J Med Genet 87:349-353 (1999)

Ion A, Telvi L, Chaussain JL, Galacteros F, Valayer J, Fellous M, McElreavey K: A novel mutation in the putative DNA helicase *XH2* is responsible for male-to-female sex reversal associated with an atypical form of the ATR-X syndrome.
Am J Hum Genet 58: 1185-1191 (1996)

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

Jantzen HM, Admon A, Bell SP Tjian R: Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins.
Nature 344: 830-836 (1990)

Johnston EF, Zeller JH, Cantwell G: Sex anomalies in swine.
J Hered 49: 255-261 (1958)

Just W, Rau W, Vogel W, Akhverdyan M, Fredga K, Graves JAM, Lyapunova E: Absence of *Sry* in species of the vole *Ellobius*.
Nature Genet 11: 117-118 (1995)

Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P: A male-specific role for *SOX9* in vertebrate sex determination.
Development 122: 2813-2822 (1996)

Kolomiets OL, Vorontsov NN, Lyapunova EA, Mazurova TF: Ultrastructure, meiotic behavior, and evolution of sex chromosomes of the genus *Ellobius*.
Genetica 84: 179-189 (1991)

Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R: Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation.
Nature 348: 450-452 (1990)

Koopman P: *Sry* and *Sox9*: mammalian testis-determining genes.
Cell Mol Life Sci 55:839-856 (1999)

Kruglyak L: Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes.
Nat Genet 22: 139-144 (1999)

Kwok C, Goodfellow PN, Hawkins JR: Evidence to exclude *SOX9* as a candidate gene for XY sex reversal without skeletal malformation.
J Med Genet 33: 800-801 (1996a)

Kwok C, Tyler-Smith C, Mendonca BB, Hughes K, Berkovitz GD, Goodfellow PN, Hawkins JR: Mutation analysis of the 2 kb 5' to SRY in XY females and *SRY* intersex subjects.
J Med Genet 33: 465-468 (1996b)

Lahr G, Maxson SC, Mayer A, Just W, Pilgrim C, Reisert I: Transcription of the Y chromosomal gene, *Sry*, in adult mouse brain.
Brain Res Mol Brain Res 33: 179-82 (1995)

Laskey RA, Mills AD: Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}J using intensifying screens and hypersensitized film.
FEBS 82: 314-316 (1977)

Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J: Strategies for multilocus linkage analysis in humans.
Proc Natl Acad Sci USA 81:3443-3446 (1984)

Lubahn DB, Joseph DR, Sullivan PM,Willard HF, French FS, Wilson EM: Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome.
Science 240: 327-330 (1988)

Matthey R: La formule chromosomique et le problème de la détermination sexuelle chez *Ellobius lutescens* Thomas (Rodentia-Muridae-Microtinae).
Arch Klaus-Stift VererbForsch 28: 65-73 (1953)

Mayer A, Lahr G, Swaab DF, Pilgrim C, Reisert I: The Y-chromosomal genes *SRY* and *ZFY* are transcribed in adult human brain.
Neurogenetics 1:281-8 (1998)

McBride D, Sang H, Clinton M: Expression of *Sry*-related genes in the developing genital ridge/mesonephros of the chick embryo.
J Reprod Fertil 109: 59-63 (1997)

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Costa JM, Souleyreau N, Kucheria K, Boucekkine C, Thibaud E, Brauner R, Flamant F, Fellous M: XY sex reversal associated with a deletion 5' to the *SRY* "HMG box" in the testis-determining region.
Proc Natl Acad Sci USA 89: 11016-11020 (1992)

McElreavey K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M: A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 3368-3372 (1993)

McElreavey K, Vilain E, Barbaux S, Fuqua JS, Fechner PY, Souleyreau N, Doco-Fenzy M, Gabriel R, Quereux C, Fellous M, Berkovitz GD: Loss of sequences 3' to the testis-determining gene, *SRY*, including the Y pseudoautosomal boundary associated with partial testicular determination.
Proc Natl Acad Sci USA 93: 8590-8594 (1996)

Meyer J, Südbeck P, Held M, Wagner T, Schmitz ML, Bricarelli FC, Eggermont E, Friedrich U, Haas OA, Kobelt A, Leroy JG, Van Maldergem L, Michel E, Mitulla B, Pfeiffer RA, Schinzel A, Schmidt H, Scherer G: Mutational analysis of the *SOX9* gene in campomelic dysplasia and autosomal sex reversal: lack of genotype/phenotype correlations.
Hum Mol Genet 6: 91-98 (1997)

Mezhzherin SV, Morozov Leonov SI, Kuznetsova IA: Biokhimicheskaia izmenchivost' i geneticheskaia divergentsiia polevok Arvicolidae palearktiki. Podzemnye polevki podroda Terricola, nastoiashchie Dicrostonykh Gloger, 1841, slepushonki *Ellobius* Fischer von Waldheim, 1814.
Genetika 31: 788-797 (1995)

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 16: 1215 (1988)

Moniot B, Berta P, Scherer G, Südbeck P, Poulat F: Male specific expression suggests role of *DMRT1* in human sex determination.
Mech Dev 91: 323-325 (2000)

Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R: *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds.
Nature Genet 14: 62-68 (1996)

Moreira-Filho CA, Toledo SPA, Bagnolli VR, Frota-Pessoa O, Bisi H, Wajntal A: H-Y antigen in Swyer-Syndrome and the genetics of XY gonadal dysgenesis.
Hum Genet 53: 51-56 (1979)

Muscatelli F, Strom TM, Walker AP Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G Rabl W,Schwarz HP, Kaplan JC, Camerino G, Meitinger T, Monaco AP: Mutations in the *DAX1* gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism.
Nature 372: 672-676 (1994)

Nanda I, Shan Z, Schartl M, Burt DW, Koehler M, Nothwang HG, Grützner F, Paton IR, Windsor D, Dunn I, Engel W, Staeheli P, Mizuno S, Haaf T, Schmid M: 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9.
Nature Genet 21:258-259 (1999)

Nordenskjöld A, Fricke G, Anvret M: Absence of mutations in the *WT1* gene in patients with XY gonadal dysgenesis.
Hum Genet 96: 102-104 (1995)

Numabe H, Nagafuchi S, Nakahori Y, Tamura T, Kiuchi H, Namiki M, Kohda N, Fukushima Y, Fuse H, Kusano M, Arai T, Matsuzaki Y, Fukutani K, Isurugi K, Kuroki Y, Ikeudu T, Yoshida M, Minowada S, Nakagome Y: DNA analyses of XX and XX-hypospadiac males.
Hum Genet 90:211-214 (1992)

Oreal E, Pieau C, Matei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D, Magre S: Early expression of Amh in chicken embryonic gonads precedes testicular Sox9 expression.
Dev Dyn 212:522-532 (1998)

Overbeek P, Whitworth D, Agoulnik A, Agoulnik I, Harrison W, Qin J, Behringer R, Bishop CE: Male sexual development in the absence of *Sry*.
Am J Hum Genet 65: Suppl (1999)

Pask A, Graves JAM: Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes.
Cell Mol Life Sci 55: 864-875 (1999)

Pfeifer D, Kist R, Dewar K, Devon K, Lander ES, Birren B, Korniszewski L, Back E, Scherer G: Campomelic dysplasia translocation breakpoints are scattered over 1 Mb proximal to *SOX9*: Evidence for an extended control region.
Am J Hum Genet 65: 111-124 (1999)

Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization.
Proc Natl Acad Sci USA 83: 2934-2938 (1986)

Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME: Sex reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes.
EMBO J 13: 6115-6124 (1994)

Poulat F, Desclozeaux M, Tuffery S, Jay P, Boizet B, Berta P: Mutation in the 5' noncoding region of the *SRY* gene in an XY sex-reversed patient.
Hum Mut S192-S194 (1998)

Raymond CS, Shamu CE, Shen MM, Seifert KJ, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D: Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes.
Nature 391:691-695 (1998)

Raymond CS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown LG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D: A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators.
Hum Mol Genet 8(6): 989-996 (1999a)

Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D: Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development.
Developmental Biology 215: 208-220 (1999b)

Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I.
J Mol Biol 113: 137-251 (1977)

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-316 (1988)

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: A laboratory manual (2^{nd} Edition).
Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)

Sanger F, Nicklen X, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467 (1977)

Schibler L, Cribiu EP, Oustry-Vaiman A, Furet JP, Vaiman D: Fine mapping suggests that the goat *Polled Intersex Syndrome* and the human *Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Syndrome* map to a 100-kb homologous region.
Genome Res 10: 311-318 (2000)

Schmitt-Ney M, Thiele H, Kaltwasser P, Bardoni B, Cisternino M, Scherer G: Two novel *SRY* missense mutations reducing DNA binding identified in XY females and their mosaic fathers.
Am J Hum Genet 56: 862-869 (1995)

Selden JR, Moorhead PS, Koo GC, Wachtel SS, Haskins ME, Patterson DF: Inherited XX sex reversal in the cocker spaniel dog.
Hum Genet 67: 62-69 (1984)

Shan Z, Nanda I, Wang Y, Schmid M, Vortkamp A, Haaf T: Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, *DMRT1*, in birds.
Cytogenet Cell Genet 89: 252-257 (2000)

Sharman GB, Hughes RL, Cooper DW: The chromosomal basis of sex differentiation in marsupials.
Aust J Zool 37: 451-466 (1990)

Sherry ST, Ward M, Sirotkin K: dbSNP-database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation.
Genome Res 9: 677-679 (1999)

Shuman S: Novel Approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
J Biol Chem 269: 32678-32684 (1994)

Simpson JL, Blagowidow N, Martin AO: XY gonadal dysgenesis: genetic heterogeneity based upon clinical observations, H-Y antigen status and segregation analysis.
Hum Genet 58: 91-97 (1981)

Sinclair A, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow PN: A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif.
Nature 346: 240-244 (1990)

Smith CA, McClive PJ, Western PS, Reed KJ, Sinclair AH: Conservation of a sex-determining gene.
Nature 402: 601-602 (1999)

Soullier S, Hanni C, Catzeflis F, Berta P, Laudet V: Male sex determination in the spiny rat *Tokudaia osimensis* (Rodentia: Muridae) is not *Sry* dependent.
Mamm Genome 9: 590-592 (1998)

Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G: Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function.
Nature Genet 12: 404-409 (1996)

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R: *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination.
Nature 391: 761-767 (1998)

Swyer GIM, Phil D: Male pseudohermaphroditism - A hitherto undiscribed form.
Br Med J 2: 709-712 (1955)

Tajima T, Nakae J, Shinohara N, Fujieda K: A novel mutation localized in the 3' non-HMG box region of the *SRY* gene in 46,XY gonadal dysgenesis.
Hum Mol Genet 3: 1187-1189 (1994)

Takamatsu N, Kanda H, Ito M, Yamashita A, Yamashita S, Shiba T: Rainbow trout SOX9: cDNA cloning, gene structure and expression.
Gene 202: 167-170 (1997)

Terwilliger JD, Ott J: Handbook of human genetic linkage.
The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London (1994)

Veitia RA, Ion A, Barbaux S, Jobling MA, Souleyreau N, Ennis K, Ostrer H, Tosi M, Meo T, Chibani J, Fellous M, McElreavey K: Mutations and sequence variants in the testis-determining region of the Y chromosome in individuals with a 46,XY female phenotype.
Hum Genet 99: 648-652 (1997)

Veitia RA, Nunes M, Quintana-Murci L, Rappaport R, Thibaud E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K, Goncalves J, Silva M, Cidade Rodrigues J, Caspurro M, Boieiro F, Marques R, Lavinha J: Swyer Syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome.
Am J Hum Genet 63: 901-905 (1998)

Vogel W, Jainta S, Rau W, Geerkens C, Baumstark A, Correa-Cerro LS, Ebenhoch C, Just W: Sex determination in *Ellobius lutescens*: The story of an enigma.
Cytogenet Cell Genet 80: 214-221 (1998)

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G: Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*.
Cell 79: 1111-1120 (1994)

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mitmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES: Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome.
Science 280: 1077-1081 (1998)

Western P, Harry JL, Graves JAM, Sinclair AH: Temperature-dependent sex determination: upregulation of *SOX9* expression after commitment to male development.
Dev Dyn 214:171-177 (1999)

Wilson JF, Goldstein DB: Consistent long-range linkage disequilibrium generated by admixture in a Bantu-Semitic hybrid population.
Am J Hum Genet 67: 926-935 (2000)

Wolf M, Schempp Vogel W: *Ellobius lutescens* Th. (Rodentia, Microtinae): Q-, R- and replication banding patterns. Chromosome 1 polymorphism in the male and presumptive heterogamety in the female.
Cytogenet Cell Genet 23: 117-123 (1979)

Wolf U, Fraccaro M, Mayerova A, Hecht T, Maraschio P, Hameister H: A gene controlling H-Y antigen on the X chromosome.
Hum Genet 54: 149-154 (1980)

Wolffe AP: Architectural transcription factors.
Science 264: 110-1101 (1994)

Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan U, Greenfield A, Koopman P: The *Sry*-related gene *Sox9* is expressed during chondrogenesis in mouse embryos.
Nature Genet 9: 15-20 (1995)

Xie, X and Ott, J: Testing linkage disequilibrium between a disease gene and marker loci.
Am J Hum Genet 53:1107 (1993)

Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meitinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G: An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita.
Nature 372: 635-641 (1994)

Zhao JH, Curtis D, Sham PC: Model-free analysis and permutation test for allelic associations.
Hum Hered 50:133-139 (2000)

Zöllner S, von Haeseler A: A coalescent approach to study linkage disequilibrium between single-nucleotide polymorphisms.
Am J Hum Genet 66: 615-628 (2000)

Zwingman T, Erickson RP, Boyer T, Ao A: Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 814-817 (1993)

7 Anhang

7.1 Sequenz: PeDax1-21B

```
   1  CGbsvCCGCG CGCTCTAGAG TACTCTCGAG AGCTTTTGAA TTCTTTGGAT
  51  CACCACTTCA AGGGAAAATG CCAAAAAAAA CCTAGAAGAC TCAGCTACTG
 101  AGAAAGAACA GGAACAGTGA GCACATTACA AATTCACCTT TCTCTCAAGT
 151  TCCAGTCACA TACACTAACC TAAAATCCAG ACTCAAATGC ACCAAATACG
 201  TAAGAGTTAT CTATGATTAA AGTAAAAATA AAATGGGTTT AAGTTTCTAG
 251  GATATTTTAA AACATAGTAA ATAAAATAAA ATATTCATGA CAGAGAAAGC
 301  TAACCTCAGG GTGATTCATT GAATTGAATT ACACATTTGA CAATGGATCA
 351  ATATCTAAGC TATATTAAGA ATTAAAAATT TGCATACCCA AGCTCCAAAT
 401  AATCCAATTA ATTAATGAAA AATGATCCAA ACAGATAGCT TTGAAAAGAA
 451  GCACAATAAA TACATGTGTA AAAAGCTCAA TGTCTTTAGA CACCAGGACA
 501  ATGCAAATTA AGCCTACCAT GAAGCTCTCT TTCATCCAGT AATAATGTTT
 551  CCTATGATGA AAGAAAACAG CAAATGCCAG CAAGGTTGCA GGAAAAACCT
 601  AACCTATAAG GGTTGTTGGT AGTGTGGTAG TGACAATTAA TTCAACCACT
 651  ATGGGAATCA ATATGGrGGT TCTGCAAAAA AAAACywwTA GAATTTCCAA
 701  ATAATTCAGs yCTGTCACTA CTAGGsGTAT ATCCCAAAGG AATCAAATTC
 751  AGTGTGAAAC AGrGATwTAT hCCCCATGCT TmCATGGCAC yCGTAATAAT
 801  AAC.GCTTAT GGTACCAGTG TCAGTGTCCA TCACTGGATG AATGAATAAA
 851  GACAG.TGTA GCACACATGC wwAGCATAGC ACAGTTTATA CmGAAATAAA
 901  GAAAAGTGGA AATCATA.TT GTTTGCAGAA AAAAAAAGrA TGGAAGTGAA
 951  ATCAACTATG TCAGACAGAA TAAGCCAT.G ATGATTTGCC ACATTTTCyT
1001  TCyAGGTATG AAATTGAGAA GAAAGGACAG CAAATGAGTG TAATATGGGG
1051  AGTnGnmATG ATAAAATACA TTAAGTACAT TAATTAATAA AATTGTCTCA
1101  GGAAGnCCAT GAGTCTGTAT AATTCACATC TCTTAATAAT AATAACCAAA
1151  GAACACTTTG AGAGCCCATT ATATCTTTAG AACAGAGGAG TCCTAATTTT
1201  TAACTGCTAA CTCAGCTTTG CTGTACAGAT TGTAACAACA CTTGTACCAG
1251  GAGCsATGAA TCTAACAAAG TCTGCTTCCT CCCTAAAGAG TCAGCAACAC
1301  AGCGACTGCG TAATAACAGG CTGCCTTTAT GTTGCCAGAT TATGATGTTC
1351  TTTCTTTCCA AAGTTAAAGT TGCCCAACAA GCACATTTTT TGAGGATCTA
1401  CTGTAAGGAG AACATTTAAC CAACTGGTAG GTACbGAGTG ACAGATTTCT
1451  TGTATnCAAG CAACTTTGAT ATGGGTTbGG AGAGAAAATC sCTAAGCATC
1501  GTTTAACTAA GTAAACAAAT CATCAGATGC TGAGAAGAAA ATTAAATTAT
1551  AACTACTGCC AGGTGGTGGT GGsACACACC TTTAAwCCCA GCACTCAGGA
1601  GGCAAAGGCA GGTGGAT.CT CTCTGAGTTT GAGACCAGCC TGGTsTACAG
1651  AGTGAGTTCC AAGACAACTk AGGsAGTTwG ACArAGAAAC TCTGTyTGGA
1701  AAAAAATTAT AmCyAGCAyT TTGACCyTAA GGkGGAAGAC TTGwGkAGCC
1751  TGTATTTTAG CTAGGCTGCT TGGnvGTTAA GAAAAAAGAT TGTTAAGCAG
1801  CAATATCAAT ATAATTAATG CAGGhGCTTG AATATTCAAA ATGACTTAAT
1851  GGAATbsbCA ATGAGTTAAC ATTGTCAATA TGAATTyTTC TCGTAGATCA
1901  CACAACCCAG GTGTAGTAAT ATTTCATTTG TATTTTAATA AAAAAAAAGG
1951  CCTGCCTGAA GATCAAGGAG TAAAACAGCC CCATTGGTCA GTCTTTCAGA
2001  CCAGGCTTTA ATCCCAGT.G GTGCATGCCT TTAATCCCAT CCCCAGAAAG
2051  GrATATTAAA ACmGGCGACA GTTCTCAGTC TTAG.CCTCA TTCTGA.GAC
2101  T.CCTGGmGG CAGGwTCsCC ATTwCArACT TGAGGTAGA. GGTAAGAGCC
2151  CAGTGGC.TG A.CTGTTTTG CTTTTCCTGA CCTTyAGGTT GAGGCCCAGT
```

```
2201  TTCTGTCTCT GGGTTTTTAT TACCCCTGAG TAGTTTGAAT CTGGAAAGGs
2251  GGATATAGnG GATAAGTnGG AACAAATnCT TGAATAGAGA ATbAGGAGCT
2301  TCATTCAGCA AGAGAGACAG CGTTATGATT GTnCTTTTCA GTATTACTTC
2351  TTGTTCCATA ATGCATCCCC TGCTGTCCTA AAACTGAGAC TTACCATGTT
2401  TAATAGTCTC CTATTTTAAA CAAATGAACT CATATATAAG GACTATATCC
2451  CAGACACTAA TGTCTACTTT TTACATGTAA AGTGCTGAGG AATAAATGAA
2501  CTAAGGAACT TTCCTATGGT AGGnTGAACA ATGTnyCCCA TAGATGTGmn
2551  GrCCCTAGTC ATAAGAAGCT GTGAATTTAG TTATGAAGTG AAAGAGGTTT
2601  TGTAGATGTA ATTAGGTTTA GGATTTTAAG ATGGCAATAT CCTTCTGGAT
2651  TATGTAGGTG GATTTAACAC AATCACAAAC TTTCATAAAA AA.AAAATCA
2701  GrGGTTAATG TGGAGACAGA AGAGGGmCTG ATGTGTCCAA GACCCArGGA
2751  wTGCAGGCAG AAGCCTGAGG AGGCAAGGCA ATAGATTCTT CCTTTGAACC
2801  ACCAGAAATG AATGGTGChG CAATTTTAGT CTAATAAAAC TGACTTTAGA
2851  TTTCTGGCTC CTCAAACTGT CATATGATAA ATTTATGTTA TTTGwGTTGC
2901  TGTAAACCAC TACATTGGTG GTAATTTTTT TATAGCAACA ATAAGAAGTA
2951  TGTTCCCTAA GGCCATGGAA CTACAAAATA ATAGAACCAG GATTTAAATn
3001  GGGTTCATTA GATGCCGGnb CAAGAAATTA AACCTCTGTG ACATAGGACC
3051  TATCAAAGGC AGAhAhCCmA TTAACTGCTG AGTACTCTGC CCTAAATGTG
3101  ACATCCATAT CAAGCCTTCA AGmAwAGGGT GCATTACATA AGCTATGGCA
3151  AAAAGACTGT AAGAGAAGAA TGTTATGAAA CTCATTTTGT ACAAAGTAAA
3201  ACCAATTGCC ATCTTGAACA CATAACAGTT ATAGGCTACC CATACCAAGA
3251  TCCGCATTAA ACCAAGATAA AAATAAATwA ATAGrTAAAT TAATAAAAAA
3301  CAAGGAAGTA GGAGGGACAT TAATTGGGAT GAAGA.GGAG AAGGAAATCA
3351  GCAGGAGAAC GGTGACTAAG TGATGGTAAT AGGAGCGAAT ATGATCACAA
3401  TAAAGTTTGC ACATGTATGA AATTGTCAAG ACGACAAAAG GGAAAACTGA
3451  GGGTGThCTC ATTTTTCTTA TGTTTCAGTG GCCCCACAGA ACTGAACAGG
3501  GAGGGAACAG AAGAGGAAGA GGGAGAATkb GAAACCAGAG AGAGGGGTCC
3551  CATACCAATT GCTGTGTTCT AGTCCCCTTT CCTATTCAGT AATGCCAGAG
3601  GCTGGTACTC TTAAAGTTGG GGvGGCTCGT GGGGATAAGA ATTGGCAAGT
3651  TACACAAAGC CAGACGGTTG AATAAAGAGb CCCCyATThT CATGTkrGAC
3701  TTAAGGAAGG AGGTCyCGTG ACAAATGTCC AGrATTCA.G GCTTTCGGrA
3751  ATCTCTGATT TTTTGTCATT ACTATTTTAG GATGGTTTGA AACAGGGACA
3801  GTAATCAGCT TTCTGCTTCT ACAAAAGAAT GTGAACTCCC ACAGTAACAA
3851  CCTTGCGATT ATCATGTTCC TATGATTCAG CTACAAGCGC ATACTGTTCG
3901  CAATCCCTGC CCCCAGCCCC TTGACCCAAG CATCCAGGAC ACAATCGGTG
3951  ATTAATTGAA TTAAGTTGAA CATTTGTTAT TGCCTGCTTC CACCAATAAC
4001  TTCCACATTT AAAGTGCATA TGTGCAGTCT GGGGATGGAT TTCATTAAAA
4051  CTCACATGCA GGTAGTTTGG CTGGGgGgAG AAAGCaTTTC AGCCTCTGtG
4101  TATGATGctg ACGCTACTGG TCTAGGGTCT ACACTTTTCA AGGTcTTAgA
4151  AAACgrGAGC TCAGCCTCCG AACGTTTTCC AAAATtCcAG TTATACAAAT
4201  TGTGATCsGT TCCATAAAAG TTTATaAgGG aTGTCATAGA AaTGGACTAT
4251  TTT.CCCGTT tAAgGtACTT CTTTCCCCmA ttAAAGGG.A AwaGATTAGA
4301  CGTCCAGAGG CCAGAGTTGG AATAGGGCCC TAACTCGCTG CCCCAG.gtt
4351  caCTACTCTC yCCCCACGTC CmGsGGAAAG AAGGATAGAG TGAGGAAGGA
4401  AGGGAGGGTC CACGAGCTCC AGCGCTGAGA CGTTCCCCTT GGATTTCCAG
4451  CTTCTAAGGA GTGTTTGCCC CTTTCAACyT CTsmGGTCAG GAGCCCACAC
4501  ATTCAAGCGC AAAGGCGCGT CCCCCTCTGT GCCCTTGTGC AGGAGGAGGA
4551  GGCGGACGCG CTTGCGTGCG CGCTCAGTAT AAATAAGTCC CAGGCGGCGG
4601  CCACTGGGCA GAACGGGCAG CAGGAGCCTC GGGCCATGGC GGGTGAGGAC
4651  CACCCGTGGC AGGGCAGCAT CCTCTACAAT CTACTGATGA GCGCAAAGCA
4701  GAAGCATGCA GCTCCGGAAG AGCCCAAGGT GCsCTT.GGG GGCTCATTGC
```

```
4751  TGGGATT.TG CCTGCGGCTC TCAGTCCG.T CGTGGGTCGG GAGGGAC.TG
4801  CCCGGCGGGC AAGCCAT.GC CCCTCCTGTA .CCGCTGCTG CTTTTGC.GG
4851  GGAGAACCAC CC.GCsCCAG GGCAGCAT.C CTCTACTATA TGCTmACCAG
4901  .CGCCAAGCA GTCAAGTkCA GTGACCGAGG CACCCAGAGC GCGATTCGGA
4951  GATCCGTkCT GGGGTTGCGC CTkCGGCAGs GCCGAGCCCC TGGTGGGCAG
5001  AGAGGGGCCs CCGGCTTGGC CGGGCCCCCT CCCTCC.GGT ATCCTkGTkG
5051  CTTCTsCGGA GAGGAGCCCC CAAGACAGGG CAGCATyTT. GTACAGCTTk
5101  CTCAC.TAGs sCCAAGCrGA yGCACCkTGG yTCCGGAAGC TCCCsAGGsA
5151  CGTCGCGGAG vCGAGTGGTG GCAGCTGTCC TACTGTACGC AGAGTGTGCA
5201  TGGCACTGAA GGGCTGCAGA GTGCACAGGC s.ATGGCGGT CCTGAAmwAm
5251  rGCyCCGkGC GCGmTGAAGA GCmsCCCCmk CwGwGCAGCk TTkyCTCTkG
5301  CACsCCCGGG AGCGCGGGTm AAACGCCCGC sGCTsCGkdA GwGCAGCCTA
5351  GGGCCCCyTk sGGGACGCCT CGTCTGACGk GCAGCGTCCT TTGGCACTCA
5401  AAAATCCACA GGTGGTGTTC GAGGCAGCAT CAGCTGGCCT GTTGAArACs
5451  CTGCAGTTCG TCA.AGAGCT TGCCCTGCTT GCCAGATCTT GCCCCTGGAT
5501  CAGCArCTGG TGCTGGTGCG GACCTGTTGG GCGCCCCTAC TCGATGCTTG
5551  AGTTGGCCCA AGTTCACCTG CACTTCGAGA TGATGrAGAT CTCTGAGCCC
5601  AGGGTsCTGC AGAGGATGCT CACCACCAGG CGCAGGAGGC CGAGGCCkTG
5651  GAGCCTGCAG ATCCGCTGAC CACAGrGCAG CCATCCGCGG AGGCTGrGCA
5701  CCTGCCCTCA GCTGCTGCAG TCCAAGCCAT AAAGAGCTTC TTTATCAAGT
5751  GCTGGAGCCT GAACATAGAT ACCAATGAGT ATGCCTATCT GAAGGGGACs
5801  GTACTCTTTA ACCCAGGTAA GCATGACAGC CTTGTACCCT GTCTCTCCAG
5851  GTCAGAAAAG CAGCATTTCT ACACACAGGC ACTTAGGAAT TTTCAGTGCC
5901  TATAGGGGTG TTGGAGCCCA CGTGAAGCCT CCTGACAGAC TCTGTGAAGC
5951  TGATGGACAC ATCCTGAATA CCTTGCCAAG TGGGTGAGCT TCTGCCAGAA
6001  ACTCTGTACT AGATGGATTG GGTGAGGTGT AAGCTTTTTA CTTGGTGCCC
6051  TACTTTTATT ATCTGCTGCT ACACAAGTTT CTGCCTTCCT GGGACATGGC
6101  GCTCTCCTCC CTCTTTAGCT GCCCCTTATG TTCAGTAACA TAACTTTTAA
6151  AAACAAATCG TTTTTGCTCA TTTCACAAAG CTCTGCTTAC ATTCCTGTTT
6201  TCCAAATTTG CCTTTAAGAA GAGCTTGTGT TGTGTGCAGG GGTGGGGGGT
6251  GGGTGGGGGA GGTGTGTCAC AAGTCTTTCC AAGCTCCTCC CCTTCAGGAG
6301  TTAGTTAGTA GTTCAGCCCA GCCCAGATTC TGCAAGTCTG CAAAAGCAAG
6351  TAGCTCAGGA GATTTTTTGA GATCCACTAG TGTCGACCTG CAGCGC
```

7.2 Sequenz: PeDmt1-11A

```
   1  GTGAATCAAA wwTACrCAvT CmTTTGGrTd CACGTGnTTA wAGCCTTATA
  51  CmCCTTAAAA TTGGrTCbCC ATTbGCCATT CAGGCkGCGC AAyTGTTGGr
 101  AAGGGCrAws GGGksGGGCC TyTTsGCnTT TwAsCCAGCT GbnnhAAGGG
 151  GrATGTCCTG CAAGGCGATT AAGTTGGGTA ACsCCAGGGT TTTCCCAGTC
 201  ACACGTTGTA AAACACsGCC AGTGAATTGT AATACGACTC ACTATAGGGC
 251  GAATTGGGTA mACTTACCTG GTACCCCACC CGGGTGGAAA ATCGATGGGC
 301  C.GCGGCG.. CTCTAGArGT ACTCTCGAGA AGCTTTTTGA ATTCTTTGGA
 351  TCCTGATGAA TGTGATGGGC TGACTAATCA ATTACCCTTT GGGGACTAAA
 401  CGGAATCTCT TCTCAGTTAT GGGAAAAAGC TTTATTGCAA CAGAGCATTG
 451  ATTTGGCTGG TCCACCAAAG TTCAAGTACT GCTAACTGTA CTTTTGCAGA
 501  ACAAGTTGGC CTATTCCAGG TCCATACTCT GGTCCCTACT AAAGAATGCA
 551  GTATCTACCA TGGAAGGACA TAAAGGAAAC AGTGTGTGCT CAAACCCAGC
 601  CCCTTACTGA GTTCCTGGGG TGACAGTAGT TTATCACATG GTAAGAATTC
 651  GTAGACAGGT TAACTGGATT TGATCTCCAG TTTCATGACA TTTGGGCAGG
 701  GGTGTGTGAG GTACGTCAGG CTTTATGTCG TTTAATCCAC CTCTAAAGTA
 751  ATTTGGTATT CTTAATAArA ATdACACAGG CCAAGGGTCT TCAGCTGTGC
 801  CACCAGCAGG AAGCCAGCCT TGGACCCCTC CCCTTGTGGC TGAAGCGGCA
 851  GCG.AGTGAC TGCTCCCTTG CAT.GGCCTG GTTCTTTGCT CAGCTTGAA.
 901  GGAAATCTTT CAGGCGTAGC TAAGG.TTTA GAGG.ACAAG GTTTGTGAAC
 951  TCCCTA.TGT TAAA.TCTTA CCCGGTCTTT T.TCTCC.TT TCCATTTCAG
1001  AGGGGCGCAT GGTCATCCAG GATATTCCTG CTGTCACCAG CAGAGGGCAT
1051  sCGGAGAACG CACCGGACCT GGTGTCAGA. CCCGGCCTAm TACAGCAGCC
1101  TTTACCAGCC ATCyCyGkTT CCTTACTACA ACAACCTGTA mAACTACCCG
1151  CAGTACTCCC ATGGCCCGGT CTGCTrAGTC CTCCTGTGGG GAGGTGGAGA
1201  AATCCCCTTG GGGGATCTCC TGTrAAGAAm AsCCTGsGGA GTCTGTCAGC
1251  mCCTTATGTG CCCsCACAGA CTGGAAACCA GTGGCAGGTA TGACCCAGAG
1301  AACGGGATAC GCAAGCACGC ATGTCCCATG CACATATATG TAAAACACAC
1351  ATGCATATAA AATACACATG CATGCACATA TGTGCCATAC ACACGCCCAG
1401  ATCAGCACCC ATGTAGTCAC AGTATGGAAA GCACmCTGGT TTTTCyTTCC
1451  ATCTGCTGAT AATGTCATTT AACTCCAGAG TTTGACTGCA GGGACTCGGA
1501  AGGGAGGTkT GCATGCATCT GGGGCTCCTT TTCAGTTTTA GCTTTCCTCA
1551  GATTGTCGTT TTGCAGAAAT ACCCAAGCTG GCCAGTATTA GAGGGCTCTC
1601  TGTGGTCACA CCTCyTCCAG CCTTCCCCAT TTTGGGGCAG CTTAGAATAT
1651  ATTAGGkkCA GCATCCTGCG GTGGwAGTCC TCyCTCCGCA AATTTTTACC
1701  CTAGGAGA.G AAAGGATTAT GATGGrTGTG TTTGTCAT.G GCATAAAGkk
1751  TkkAAAGGGA ATTCCsyTTG TGTTTGTGAT GGCCCAGTAA CAwACGTGGG
1801  TGTTTTTTAG AAAwrGATAT CCGTCTGTCA GAGCACACAC ACTACACACw
1851  ACACGCACwC ATwwATTAAA ATAGTGTGCA GCCAAGCTTT CAACATTTGG
1901  wGCAAAACAG TGTTTTGCCT CATTGGGGAA AGAGCTTTTC CAGGAGCGGT
1951  TCTGTTTCTA AGGGTGACGC GATTCCCATC AGGTCATTCA TTGTGTTAGC
2001  ACCAGAAGCA CTCCGAGGCT AGGAGTAGCT GAGAGGTTTA GACTCACACC
2051  ACCAGGGCGC AGAAGAGGCT GTGATTCTGC AAGAACTGTG AyTCACCATG
2101  GCTGTGTGAA CATGCCGAAG TGGTCTCAGT AAGGGTTTGG TTGCAGTACA
2151  GTGTAACATA CATTTAGGAG TTAGTGCACT CTTGGATGCC CTCTTTGCTC
2201  CTTAwTTTCT TAGCTTwATT GAGGTATAAT TGACAAATTG GATGCATTCA
2251  TACTGTACAG TGTGGTGTTC CTGACGTGTG TkTACmCTGT GCsTTGCTTA
2301  TCACAGTCGG GTTAATGAAG GCACCTGTGT GTGTGCTTGC ATTCACCTGA
2351  GGyTCAGTyT GCGTTTTTCA GATATGmAGk wTTwTGGrTT AwrGCTmCCA
```

```
2401  CATkGTACAT TCAACTTCCA GAACTTAAAA ATTGAAAGTA AAAACGTGGA
2451  TGTATGTCTC TCCACTTCTC TAACCCCAAC TCTCTGGAAG TCAGCATTGC
2501  AAATTTCTGT TTCCTAGAGT TAAGTTGTTT GAATGGACTT TAACTTTCTT
2551  AAGCCAAATT CTAAAACGTT TTGACCTGAC ATTTTCCTCT AACCAAGTCT
2601  GTTTCATCCA CCCCCCCCTT TTGAAGTGAA GGAATTATTA ATATTCAAGT
2651  CATCTCACTT TGGrrGATTC TCTTGCTACA CTCAGGGGAT CTGACTAGTC
2701  CCCTTCTCTT AAGTTTTGTG TGTGCCTTGG GGTGCATGCA TGTTTCCATC
2751  TGTGTAGTCA GGTACACATT GCmCATAGAG TGTbTTyCTG GCGGAACCAA
2801  AGGTTGAACC TTGGTkGTCT TTCyyAAATC wmTCmAAmCT TTATCCAGCA
2851  AGGmCAGGGC TCTATCATGA ATGCATGTAT TTGGCTAATA TTAACmmGCC
2901  ATTTTGCTCT TGGGATTTCC TGnmwCTGvy CTTCCTGTGA GGGGGCTATG
2951  GGGAGGCCAC AATGCCTGCC TGACGTTTTT TTTTCACATG GGTCTCCAAG
3001  ATCTGsTCCy CyGGTATTAC ATGGwCAGCA CTTGTGwTGT TTCCTCAGmC
3051  yCACACTGTG TTTTTTGGAG GGAGACTTAA AACTTGTGGG TGTTAGAATT
3101  GAGAGGTATT GTGAGGATAA TGGGGCTCTG GTGGACTTCC AGCTGGACCT
3151  CTTCAGACCT TTCTAGTATG GTAGATTTTA TGGTTAGGAG AAGGTTTGCA
3201  GTTGGCTTCT GTTGACAGCT CTCTTCCTGT GGGGAGAAAG AAACATCTTA
3251  AGAAATTTAA ACAAGCCAGG ACCTGGTGAT GCACTCCTTT AACCCAGCAC
3301  TCAGGGCAGA GGCAGGCAGA TCTCCCTGTT CAAGCCTAGT CTGGTCTACA
3351  GAGCAAGTTC CAGGACAGCT AGGGCTACAC AGAGAAACCC TGTCTTGTAA
3401  AACAAACAAA GAGACAAACA AACAAACAAG ATTTAAACAA AGCAGACCTT
3451  CTTGCTGGTC CTGCAGAGAC CCTGGGATAT CAGTTGCTAC TGGCCGGTCT
3501  GGCTTTTCTG TGTCTAGCCT TTGGTAATAG GGTAGTTGGG TGGGTCTCTG
3551  AACCTGATAG GTTAATTGAT AAAGCCTGGT GGAAAGGCAG CTATCTCCAT
3601  TTGCATCTTA ATCACGTCCT CTAAACCTGT GGCCTCTTCC TTTTGTCAGA
3651  ACCCCTGTGA CAGCTGTTAG TTCCCGACmC AGTGATGTAG CCCTGCCTCT
3701  CTTTTCTGCn AAGGACTAGC AAAGTCATGT TTGAGGTCTT AGTTCAACCT
3751  GGAGATGGGG CCACTCACCA GGrGCATCTT GCTGGGGTGT TGGCAGGTCC
3801  TTCCTGTTGT GCCCTAGGTG rCACCACCCT TCCCCTCCTG CAGAAGGGGC
3851  AAGGAATCTs CTGAGAGAAG CTTCmCTTAG ACACATkTAC mAGCCAACCm
3901  rrkTGGGAAG GGAAACTGGs AAACTTyCTm AGTCCTkTkA GAsCCGAGAs
3951  CCAGATGTkT TTAGTAGTGC CCTCCCCAAA ACCACTAGAC CAGAAATAGG
4001  CATCATTGTC CTAGCCCCAG GAGATACACT AAGTATCATC TCATGTGATT
4051  TTATTTCCTC AGAGGCCCTT ATTTAAATCT TTCTCTCCAA GATCTGATGT
4101  ATTCTCATGT AACAGGCTAC TCTGGAGCAA TAGGTCCTTC TGTCCTGCTG
4151  TGGCAGATGT TCTCAATAAC ACAAGCAACA AAAATTGTCA TTTATTGAGC
4201  AATTCGTTGT AGTTGTTTTT TTTTTTTTTT AACTCTTTGG AGGCCTACCA
4251  CCCAGCTCCC AAATAAATAG ATGGAGACTT ATTCTTACTT ATGAATGCCT
4301  GGCCTTAGCT TGGCTTGTTT CTAGCCAGCT TTTCTTAAAC TAACCTGTTT
4351  CTCTCCTATG TTTTGCCTCT GGGCTTTTTT ACCTTTCTTT ATTCTAAAGG
4401  TCTTTCTTCC TTyCTTACTC TGGTTGGGTG GCTGAGTGGC TAGGTAACTG
4451  GGTGGCTGGG TAACTGGGTG GCTGGGTGGC TGGGTAACTG GGTGGCTGGG
4501  TGGCTGAGTk GCTGGGTAAC TGGGTGGCTG GGTGGCTGAG TkGCTGGGTA
4551  ACTGGGTGGC TrAGTGsCTG GGTAACTGGG TGGCTrAkTG GCTGGGTAAC
4601  TGGGTGGCTG GGTAACTGGG TAACTGGGTG GCTGGGTAAC TGGGTGGCTG
4651  GGTGGCTAGC CGGCTGGCTC CTGGCATCCT CTCCTCCTTT TCTCACTCCT
4701  AGCTTTCCTC TCTGGACCCT AGATTTGCTC CTCCTATTTA TTCTCCTTGC
4751  CTACCAGCCC TGCCCATTTC TCTCTCCTTC CTAGCTGTyb GCCATTCAGC
4801  TCTTCATTAG ACCAGTCAGG TGTACAGAGT AACACAACTT TGCAGAGTAA
4851  AACAAATGCA ACATAAAwGA ATGCAACACA TCTTTGCATC ATTAAACAAC
4901  TATTCCACAA CAGTAACGAA TGTAACACGT CTTAAACTAA TATTCTACTA
```

```
4951  CAGTTAGTTC TGCCTACTTT TCAGGGGAGG AATGATACTG TCCTTTCTAA
5001  TGGTGAGGGG GTCAAGATTA AAAGGGGAAT kACTTTyCCA AGGTCCCACA
5051  GCACCAAGGk wAGAGCCAGG GTTTAACCTG ACTTTAAGTG TTTbhhwGGA
5101  GTGTCTGACC ATCACTGGGT CTGCAGCAAA CTTwGGCCTG CAGAAtTTGG
5151  ctttCAGGAG TCATTGTGAG TAGGGATCCT GGGCACACTT GTGAGTACAG
5201  TGTCTCAGCA GGTCAGcCCT CAGCTGTGGG GTGGAGCCCC TATAAAATGc
5251  tCAGGTCCTT CATTGCTTAA GGCTTAGAGT TGTTGCCTAA GCCCTGTGTT
5301  TCCTGCTGAA GATCTTTTCG GAACTCTCTT CTGTCTTTCT TCACCCAT.G
5351  CAGGTCAGAA ACAAGCACAA GTATCTT.GA GGAGAG.CTG A.TGTGTGGA
5401  TGTTTGAGAT GACCGAGGGT AGCCCTThCG TGAATTCCTG AAAGACCTAG
5451  TCCCA.CGGG TCACTGTCTA AAATAAG.CT ACATTGCTAA TTTGAAGTTA
5501  C.TTTTGGAA TCT.GCATAA CAGTTTTCTG GCTGTAGTGA AGAGGCGAGC
5551  nGGCCTGCTT TTCGTCCCAC CCGGCTCCCG TdC.AGCTAG CTTATGCCCC
5601  GAAATAACAA CCCmAAAATT GTATTC.ATT TAAACACTGC CTGGGCTATT
5651  ATATCTAGGC TCTTCATGGC TAACTCTCAC ATyTTGATTA A.CCATTTCT
5701  AAwAGbCTGT GTCCCmCCmm CvAGGTGGTs GCTTmCCmGG GAGATTATTA
5751  CCCmCmTCCA TyTTGGGTAA rAGCTTmATG CAG.yGCCTG ACyCGGCTTy
5801  CT.TCCCCCA GAATTCCG.T CCGTyTAm.C CCCCCmCyT. AGGGCTGGCC
5851  yATC.Avnvs sCAAGGvrG. TTyTTTwwTA AmCCATGGAA GGkACCCCyy
5901  AGGCmG.TGm CCC.CCsAmA wAAAA..TGA wGG.GrAwdA GGs.CCAGGG
5951  GGGGGATACC CAA.GTAwGk TAGCA.AGTG ATCCCCAGkG TGGrCCbCAG
6001  GssmCmAnTC CAGwTTT
```

7.3 Sequenz: eSox9l1

```
   1  AAGsTATTTA GGTGACACTA TAGAATACTC AAGCTATGCA tCAagcttgG
  51  taccGAgctC gGAtccACtA GtaACgGccg cCAgTgtgCt ggAattCgCc
 101  cttgggtgGt CcttcttgTg ctgcaCGcgc agcGctccgc ctcCtccacG
 151  AagGGTCtcT TTTCgctTtC GTTCagcaGt CTGGgAagaG gagCagaaga
 201  aaa.AggGGG GTCAGtgAAA CCCcAGGaGC TGTCATGTcC CCACCCCTCC
 251  TTcGcGcACT TcCCCTCCTC CCTCCATTTG GCTTGCTATC CTCCACTGAG
 301  ACTCAGAACT TTTCTTTCTT tCTTCtAAGT GC.TCGGAGT CGACcTG.AA
 351  CGGTcAcTCT Tcgccccgc. .cccTccccG GcCTCCTATT TTGGAAACCC
 401  C.GAAGaTGA AAATAGCTCC CTGCTGAGGC TGCTCTAAAC GCCTTTGCTA
 451  CcGGagcGGT CCA.CcccCc TCCcAAcACC CTGTAAAAAC TTTCCGAAAA
 501  CCCACTTAAA TTGCAAGAAG CTCTCAGTCG GTccacGCCC CTACCGGTTC
 551  TCAGTAGCTT TCCCTAATTC TTGCCTGGGT CACCCTCCAT CCCAGCTTTC
 601  CCTTCATcCC GTCTtCCCAG GAAAGAGCGc aACTTGAGGG GAGTtg.cgg
 651  AgGGGGGAGA TTGCGTCCCC TAATTGttCC tTTCGAGGGG ACCGAGTTGG
 701  CACACCCCTC ATTcCCCC.A CC.GTtCCTA AGaGCAATcA CTTACGTGAt
 751  acaCaAcacc gcscccCCcc cacgcgccgT cgccAaGaGc TaAcTCaAGa
 801  atTtTctcaA AcTTtGaGCC AACctccCCt AgccgcTTcC catctcgcat
 851  cCCgGccCCt cagGtcccAG GctgcAActc cttggctcAG Ggaggcgggc
 901  cgcggtcggT .gAgtgcatC CCctgtcccG gtAgcaccga g.cCcAcct.
 951  gcGgtcctGa gcacwcAccT mcAgaGtttg cccAgagTcT tgctgagcTc
1001  r.gcgta.ag ggcgaatTct .gcagatatc catCacacTG GcGGCcgcTC
1051  gagcatGCat ctagAGGgCC CA
```

7.4 Sequenz: eSox9l2

```
   1  AGAATTCGCC CTTnCAGCTC GCCGATGTCC ACGTCGCGGA AGTCGATGGG
  51  GGGCTGTCTG cyscCCTCTg CcAGAgGh.G CCmywytcGC TTCAGGTCAA
 101  CTTTGCCAGC TTGCACGTCG GTTTTGGGAG TgGTGGGTGG GGTCGGTGGA
 151  CCCTGAGATT GCCCTGAAGG CAATAaaAGA GAAAGACAAA CCGTAAAAAA
 201  ATCAACAAAG GCTgTGCAAA g.CCCCCTGG TC.TTAGGaG CCCCCTGGGG
 251  AACCTCCgCG GtTGCTAAGG tGTCTTTAGG ACCCGAG.CC CgCgCAg.gA
 301  GGCGCGCTGC ACCAG.cGAT AAgTCgCCGA ATGATTaACC CgCaGGtaCA
 351  CAC.TaGGcG aGctcccTTT TatcA.GGGG aGGGGTc.Tg aGGTCCCAA.
 401  GGGTCC.GGa aGaCTaAAaT tGcTaCctGt a.gaAGAg.T gTgTgctTTt
 451  GGGGgTgaGG CGcaAAGg.r GaAAAGtGGG CAAG.TTtCg Tg.AGGTgTk
 501  TgTkTg.TGc ACGtgtgtGt AtGtGtGtgC ccgtgtgTgt gtctCGa.gc
 551  GcgcCygCcC aATTTCGGTg GGTgCTggaC AGGgAGGgag Tkc.AGGgaA
 601  TTcCCTac.T TcAAGGagcg cgaAgTcCCC aCCC.AGatT ctcggGgggg
 651  gggragcgcg CtTtaggG.t gtgCCcGtgG ggcCCA.gag tgGctAAgtc
 701  tA.gtGGGtc ACtTTtg.cc TtacTcacc. ggagTGcTcT ccc.GgGgaG
 751  tgcaCCtcg. cTcA.TgCc. GgaggagGag t.TgcggGgA gtcgGc.TtG
 801  gaGcg.cCTT gaAga.TgGC gTTgGGagAr AtgTg...Ag T..cTg.TtC
 851  TGtgGCctcc .tcGgCgtt. .tGcctGcCc gttcttCACg GGrCTTccwC
```

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Vogel danke ich für die Aufnahme in die Abteilung Medizinische Genetik / Humangenetik, die Überlassung des Themas, sowie für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Frau Prof. Dr. I. Reisert danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre freundliche Bereitschaft zur Übernahme des Korreferats.

Ich danke auch Herrn PD Dr. G. Assum und Herrn PD Dr. W. Just, für die Bereitschaft, als Wahlprüfer aufzutreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Just für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit. Seine ständige Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft bei allen auftretenden Problemen haben sehr dazu beigetragen, daß mir die Arbeit, trotz diverser ‘Rückschläge’, immer viel Spaß gemacht hat.

Frau A. Kollak und Herrn Prof. Dr. H. Hameister danke ich herzlich für die Durchführung und Auswertung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung.

Ich danke Frau A. Schulze und Frau T. Trautmann für ihre Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft - nicht nur bei den Laborarbeiten, sowie allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die nette und harmonische Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt aber auch allen Mitgliedern der gesamten Abteilung Humangenetik für das gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und viele hilfreiche Diskussionen.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinem Freund Christian, meiner Familie und allen Freunden dafür, daß sie mich vor allem während der letzten Monate gelegentlich daran erinnert haben, daß es auch noch ein Leben außerhalb der Universität gibt.