

Gunter H. Scharer

Dr. med.

Molekulargenetische Diagnostik von Enzymdefekten der Steroid 21-Hydroxylase bei Patienten mit adrenogenitalem Syndrom

Geboren am 22.05.1963 in Niederbühl/Rastatt

Reifeprüfung am 18.05.1982 in Rastatt

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1989 bis SS 1996

Physikum am 20.09.1991 an der Freien Universität Berlin

Klinisches Studium in Berlin und Heidelberg

Praktisches Jahr in Bad-Mergentheim und New York, USA

Staatsexamen am 04.11.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Ulrich Schwabe

Enzymdefekte der Steroid-21-Hydroxylase sind die häufigste Ursache (>90 %) für das adrenogenitale Syndrom (AGS). Das AGS tritt in drei klinischen Formen auf: a) klassisches AGS mit Salzverlust, b) einfach virilisierendes AGS, c) nichtklassisches (*late-onset*) AGS. Die 21-Hydroxylase wird durch das CYP21B-Gen auf dem Chromosom 6 kodiert.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines molekulargenetischen Diagnoseschemas zum Nachweis von Defekten des CYP21B-Gens. Das Schema sollte das *Screening* einer großen Patientengruppe ermöglichen und in der pränatalen und perinatalen Diagnostik anwendbar sein. Nach spezifischer Amplifikation des CYP21B-Gens mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die drei häufigsten Mutationen (Deletionen, *splice-site* Mutation im Intron-2, Ile172Asn-Mutation im Exon-4) durch Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP), bzw. Heteroduplexanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse wurden mit der parallel durchgeführten DNA-Sequenzierung des kompletten CYP21B-Gens verglichen. Für diese

Arbeit wurden 13 Patienten (5 männliche und 8 weibliche) aus dem Patientenkollektiv der Universitätskinderklinik Heidelberg mit der gesicherten klinischen Diagnose eines Salzverlust-AGS beziehungsweise eines einfach virilisierenden AGS ausgewählt. Außerdem wurden die Eltern und Geschwister in die Untersuchung einbezogen.

Alle durch den Deletionsnachweis mittels PCR, bzw. die durch SSCP erhobenen Befunde konnten durch direkte DNA-Sequenzierung bestätigt werden. Auf 26 untersuchten Patientenallelen wurden 6 Deletionen, 12 Intron-2-Mutationen und 7 Ile172Asn-Mutationen nachgewiesen. Bei einem Patienten wurde durch die Sequenzanalyse eine weitere seltene Mutation (Gln318t) gefunden. Mit dem angewandten Untersuchungskonzept wurde eine hohe Sensitivität (>90 %) und Spezifität (100 %) beim Mutationsnachweis im CYP21B-Gen erreicht.

Das Diagnoseschema ermöglicht bei geringem Aufwand die schnelle Erfassung (2-3 Tage) der drei häufigsten Mutationen, die zum Salzverlustsyndrom bei AGS führen, und ist damit auch für die perinatale Diagnostik geeignet. Um die Sensitivität zu erhöhen, können weitere Mutationen in das Diagnoseschema einbezogen werden. Durch die relativ geringe Länge des CYP21B-Gens ist eine komplette DNA-Sequenzierung ebenfalls in kurzer Zeit möglich. Sie sollte in jedem Fall durchgeführt werden, wenn bei gewünschter oder bestehender Schwangerschaft und dem Vorliegen von Krankheitsfällen in der Familie ein adrenogenitales Syndrom ausgeschlossen werden soll. Das gleiche gilt, wenn das angewandte Konzept von Deletionsnachweis und SSCP-Analysen nur den Nachweis einer Mutation auf einem Allel erbringt.

Die direkte DNA-Sequenzierung kann seltene oder unbekannte Mutationen auch im Bereich von regulatorischen Sequenzen des CYP21B-Gens erfassen.

Das Phänomen der „bevorzugten“ Amplifikation, das im Fall des Sequenzpolymorphismus A→C an der Position der *splice-site* Mutation im Intron-2 auftrat, kann zum Verlust eines Allels in der primären PCR führen. Eine allelspezifische Amplifikation ist hier angezeigt.

Als Bestandteil eines Untersuchungskonzeptes zur Diagnostik des AGS ist die SSCP-Analyse der direkten DNA-Sequenzierung nicht überlegen. Sie eignet sich für ein *screening* größerer Patientengruppen hinsichtlich einer oder weniger Mutationen, wie sie zum Beispiel beim nicht-klassischen AGS auftreten.