

Michael Decker

Dr. med.

## **Klinische Symptomatik, Steroidhormone und Mutationen der 21-Hydroxylase bei Patienten mit klassischem und nicht-klassischem adrenogenitalen Syndrom und Hyperandrogenämie**

Geboren am 06.07.1968 in Kirchheim / Teck

Reifeprüfung am 03.05.1988 in Wendlingen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis WS 1998/99

Physikum am 28.08.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Berlin (FU)

Staatsexamen am 15.12.1998 an der Freien Universität Berlin

Promotionsfach: Pharmakologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. U. Schwabe

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war, Korrelationen zwischen klinischen Symptomen, Steroidhormonspiegeln (basal und nach ACTH-Stimulation) und Mutationen im aktiven 21-Hydroxylasegen (Cyp21B-Gen) bei Patienten mit klassischem und nicht-klassischem adrenogenitalen Syndrom, sowie bei Patientinnen mit klinischen Symptomen der Hyperandrogenämie zu untersuchen. Drei verschiedene Patientengruppen wurden untersucht: Die erste Gruppe bestand aus Patienten mit einem bei Geburt diagnostizierten klassischen AGS. In der zweiten Gruppe wurden Kinder aufgenommen, bei welchen aufgrund der klinischen Symptome (Pseudopubertas praecox, Klitorishypertrophie, Hirsutismus und beschleunigtes Knochenwachstum) ein late-onset AGS angenommen wurde. In der dritten Gruppe wurden Patientinnen untersucht, bei denen im Erwachsenenalter ein Androgenüberschuß klinisch symptomatisch wurde. Die wesentlichen Symptome dieser Patientinnen waren Hirsutismus, polyzystische Ovarien, Menstruations- und Fertilitätsstörungen, aber auch Akne und Alopezie. Bei allen Patienten wurden die klinischen Befunde erhoben, Steroidhormone bestimmt und das Cyp21B-Gen molekulargenetisch untersucht.

Der molekulargenetische Nachweis von Mutationen im Cyp21B-Gen erfolgte durch die vollständige DNA-Sequenzierung dieses Gens. Hierzu wurde ein Sequenzierschema für die Anwendung auf einem Licor-Sequenzierautomaten entwickelt. Mit dieser Methode ist gegenüber anderen Verfahren (z.B. Allel-spezifische Oligonukleotid-Hybridisierung) neben

dem Nachweis bekannter Veränderungen auch die Detektion bisher unbekannter Mutationen im Cyp21B-Gen möglich.

In der Patientengruppe mit klassischem adrenogenitalem Syndrom haben 12 von 14 untersuchten Patienten homozygote bzw. compound-heterozygote Mutationen. Bei compound-heterozygoten Patienten ist die Kombination der zugrundeliegenden Mutationen von Bedeutung. Führen beide Mutationen zu einer Restaktivität von 0 % auf dem entsprechenden Allel, entwickelt sich ein Salzverlust-AGS. Bleibt durch die zweite Mutation eine Restaktivität der 21-Hydroxylase erhalten, kann ein Salzverlust-AGS oder ein einfach-virilisierendes AGS entstehen. Dadurch kann bei compound-heterozygoten Patienten vom Genotyp in manchen Fällen nicht unmittelbar auf den Phänotyp geschlossen werden. Möglicherweise kompensiert *in-vivo* auch eine extra-adrenale 21-Hydroxylase teilweise den adrenalen 21-Hydroxylasemangel. Bei 2 Patienten wurden heterozygote Mutationen im Cyp21B-Gen nachgewiesen. Dabei kann durch eine heterozygote Mutation allein die klinische Symptomatik nicht zustandekommen. Bei diesen Patienten liegen möglicherweise zusätzliche Mutationen in den regulatorischen Sequenzen des Cyp21B-Gens vor.

In der Patientengruppe mit Verdacht auf ein nicht-klassisches adrenogenitales Syndrom ist, ausgehend vom klinischen Leitsymptomenkomplex der Pseudopubertas praecox, die alleinige Bestimmung der basalen und ACTH-stimulierten 17-Hydroxyprogesteron-Steroidspiegel nicht ausreichend, um zwischen homozygoten, compound-heterozygoten und heterozygoten Patienten bzw. Patienten ohne genetische Veränderungen im Cyp21B-Gen zu unterscheiden. Eine zusätzliche molekulargenetische Untersuchung des Cyp21B-Gens ist erforderlich. Diese ergibt, daß Patienten mit homozygoten bzw. compound-heterozygoten aber auch mit heterozygoten oder fehlenden Mutationen Symptome einer Pseudopubertas praecox aufweisen. Bei Patienten mit molekulargenetischen Veränderungen im Cyp21B-Gen liegt ein late-onset AGS vor, wogegen bei den Patienten ohne solche Veränderungen andere Ursachen der Pseudopubertas praecox (zum Beispiel idiopathische Formen, zentrale Ursachen, Hypophysentumoren, Nebennierenadenome) zugrunde liegen können. Ungeklärt ist noch, ob eine heterozygote Mutation die klinische Symptomatik einer Pseudopubertas praecox bewirkt, oder ob durch zusätzliche Mutationen in den regulatorischen Sequenzen des Cyp21B-Gens, die bislang nicht nachweisbar waren, die Symptome im Sinne einer compound-heterozygoten Mutation erklärt werden können.

Bei 36 Patientinnen mit klinischen Symptomen der Hyperandrogenämie konnte aufgrund der Symptomatik die Ursache des Androgenüberschusses nicht ermittelt werden. Das klinische Erscheinungsbild unterscheidet sich nicht für die verschiedenen Ursachen der Hyperandrogenämie (late-onset AGS, ovarielle Dysfunktion, idiopathischer Hirsutismus).

Bei 47 % der Patientinnen wurden Mutationen im Cyp21B-Gen nachgewiesen, wie sie bei Patienten mit einem late-onset AGS typisch sind. Bei 53 % der Patientinnen wurden keine Mutationen in Cyp21B-Gen gefunden. Patientinnen mit homozygoten, compound-heterozygoten, heterozygoten und ohne nachweisbare Mutationen im Cyp21B-Gen sind

klinisch symptomatisch, unterscheiden sich aber nicht hinsichtlich der Symptome Hirsutismus, polyzystische Ovarien, sowie Menstruations- und Fertilitätsstörungen.

Bei der Untersuchung der Steroidhormone 17-OHP, 17-OHPreg, DHEA, DHEA-S, DHT, Cortisol und Testosteron, sowie des LH / FSH-Quotienten wurden bei den untersuchten Patientinnen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Auch in der Patientengruppe ohne Mutationen lagen die basalen und stimulierten Steroidhormonserumspiegel im oberen Normbereich oder waren pathologisch erhöht. Signifikante Unterschiede wurden nur für ACTH-stimuliertes 21-Desoxycortisol gemessen. Für diesen Parameter wurden im Vergleich zu den anderen Gruppen bei den Patientinnen ohne Mutationen niedrigere Serumspiegel bestimmt. Eine mögliche Ursache könnte eine adrenale Enzymhemmung sein, die allerdings nicht weiter untersucht wurde.

19 % der Patientinnen mit Hyperandrogenämie haben eine compound-heterozygote bzw. homozygote Mutation im Cyp21B-Gen. Damit ist bei diesen Patientinnen ein late-onset AGS als Ursache der klinischen Symptomatik anzunehmen. Heterozygote Mutationen wurden bei 28 % der Patientinnen nachgewiesen. Die klinische Symptomatik dieser Patientinnen kann erklärt werden durch: 1. Zusätzliche Mutationen in den regulatorischen Sequenzen des Cyp21B-Gens, wodurch die Symptomatik über eine compound-heterozygote Mutation zustande kommen könnte, 2. Heterozygote Mutationen, welche zu einer Funktionseinschränkung der 21-Hydroxylase und zu einem leichtem Androgenüberschuß führen, welcher sich erst nach Jahren klinisch bemerkbar macht, oder 3. Mutationen, welche mit der klinischen Symptomatik nicht kausal zusammenhängen. Der Androgenüberschuß hat dann eine andere Ursache. Bei Patientinnen ohne Mutationen im Cyp21B-Gen sind die folgenden Hypothesen als Erklärung möglich: 1. Es liegen andere seltene genetische Veränderungen der Steroidhormonsynthese (z.B. Defekte der 11 $\beta$ -Hydroxylase oder der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase) vor und die Patienten leiden an einem late-onset AGS. 2. Es liegt eine hypothetisch angenommene adrenale Enzymhemmung zugrunde, welche ihre mögliche Ursache in einer ovariellen Dysfunktion hat. Auf eine ovarielle Ursache könnten die klinischen Symptome wie Hirsutismus, polyzystische Ovarien und Menstruationsstörungen hinweisen. Eine adrenale Enzymhemmung würde die in dieser Patientengruppe erhöhten Steroidhormonvorstufen bei signifikant erniedrigtem 21-Desoxycortisol erklären. 3. Die Patientinnen haben einen idiopathischen Hirsutismus.

In dieser Arbeit wurden bei 47 % der Patientinnen mit klinischen Zeichen des Androgenüberschusses eine adrenale Ursache molekulargenetisch nachgewiesen. Für Patientinnen mit Hyperandrogenämie ohne genetische Veränderungen kann über die Ursache lediglich spekuliert werden. Weitere Untersuchungen mit ovariellen Funktionstests sind deshalb zur Differenzierung der Hyperandrogenämie notwendig.