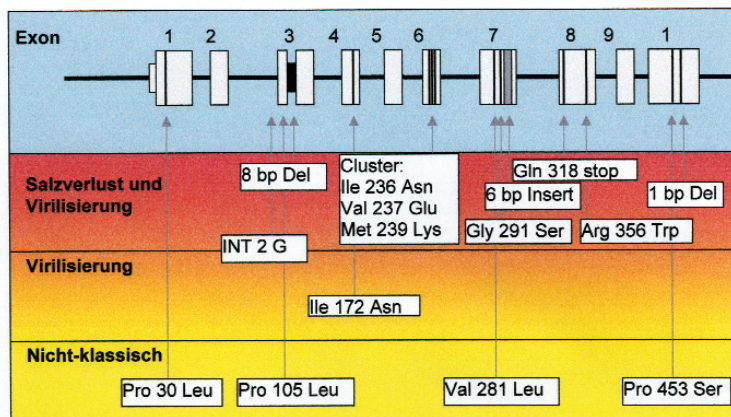


21-Hydroxylase-Mangel und andere Ursachen des kongenitalen adrenogenitalen Syndroms

Wolfgang Höppner

Labor für Molekulare Genetik,
Bioglobe GmbH, Hamburg

Abb 1 Position und phänotypische Auswirkung der wichtigsten AGS-auslösenden Mutationen im CYP21-Gen bei homozygoter Konstellation.



Zusammenfassung

Der Begriff kongenitales adrenogenitales Syndrom AGS) (im Englischen „congenital adrenal hyperplasia“ – CAH) fasst mehrere autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankungen zusammen, die zum Cortisolmangel und inadäquaten Konzentrationen von Mineralocorticoiden und androgenen Steroiden führen. Hormonexzess- oder -mangelsyndrome können je nach Enzymdefekt auftreten. Der unbehandelte Cortisolmangel führt zur permanenten Stimulation der adrenalen Hormonproduktion und dadurch zur Hyperplasie. Als Folge können Intersexualität bei Mädchen und Knaben sowie Störungen des Mineralhaushaltes auftreten.

Die verschiedenen Formen des AGS können durch genetische Tests unterschieden werden. Die häufigste Ursache für das AGS ist der 21-Hydroxylase-Mangel (über 90% der Fälle). Der molekularbiologische Nachweis dieser Form des AGS spielt in der pädiatrischen und gynäkologischen Endokrinologie sowie in der humangenetischen Beratung eine zentrale Rolle für die Bestätigung der Diagnose, die Abschätzung des zu erwartenden Phänotyps und als Grundlage für die pränatale Therapie mit Dexamethason.

Schlüsselwörter

kongenitales adrenogenitales Syndrom, AGS, 21-Hydroxylase-Mangel, Hormonexzess-Syndrom, Hormonmangelsyndrom

Hydroxylase deficiency and other forms of congenital adrenogenital syndrome

Abstract

The term congenital adrenogenital syndrome (also known as congenital adrenal hyperplasia – CAH) comprises several inborn errors of metabolism leading to cortisol deficiency and inadequate concentrations of mineralocorticoids and androgenic steroids. Hormone excess or deficiency syndromes can occur according to the affected step of adrenal steroidogenesis. If untreated, the lack of cortisol leads to a permanent stimulation of hormone synthesis and subsequently to adrenal hyperplasia. The clinical consequences can be ambiguous genitalia in girls and boys as well as sodium imbalance.

The different forms of AGS can be distinguished by genetic testing. The most common cause for AGS is 21-hydroxylase deficiency (more than 90%). The genetic test for this form of AGS plays a pivotal role in paediatric and gynaecological endocrinology as well as in genetic counselling. It is important for the confirmation of the diagnosis, prediction of the phenotype identification of heterozygous carriers and as a basis for a prenatal therapy with dexamethason.

Keywords

congenital adrenal hyperplasia, CAH, AGS, hormone excess syndrome, hormone deficiency syndrome

Einleitung

Unter dem Begriff „kongenitales adrenogenitales Syndrom (AGS)“ (Synonym: congenitale adrenale Hyperplasie (CAH); vor allem in der englischsprachigen Fachliteratur verwendet) werden mehrere Stoffwechselerkrankungen zusammengefasst, die zu einem Cortisolmangel und zu inadäquater Synthese adrenaler Steroidhormone führen.

Es handelt sich um autosomal-rezessiv vererbte Defekte der Cortisol synthese, die in allen sechs an der Synthese der Steroidhormone beteiligten Enzymen vorkommen können. Nur Cortisol ist als Endprodukt des Stoffwechselweges in der Lage im Hypothalamus die Sekretion des Corticotropin-releasing-Hormons (CRH) und in der Hypophyse die Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) abzuschalten. Der nicht behandelte Cortisolmangel führt zu einer permanenten Stimulation der Hormonproduktion in der Nebennierenrinde und damit zur Ausbildung einer Hyperplasie. Je nachdem, auf welcher Stufe der Hormonsynthese der Defekt vorliegt, akkumulieren die Zwischenprodukte vor dem Block und es kommt zu inadäquaten Konzentrationen von Mineralocorticoiden und androgenen Steroiden. Hormonexzess- oder -mangelsyndrome können je nach Enzymdefekt auftreten.

Steroidbiosynthese

Der Ausgangsmetabolit der Steroidhormonsynthese ist das Cholesterin. Die wichtigsten Endprodukte in der Nebennierenrinde sind das Cortisol

Tab 1 Klinische und biochemische Veränderungen bei kongenitaler adrenaler Hyperplasie

Stoffwechselstörung	Intersexuelles Genitale	Salzverlust	Postnatale Virilisierung	Plasmasteroide erhöht	Plasmasteroide erniedrigt
Lipoidhyperplasie (StAR-Gen)	Jungen	Ja	Nein	Nein	Alle Steroide
HSD3B2-Mangel	Jungen	Ja	Ja	DHEA, Pregnenolon, 17 OH-Pregnenolon	Aldosteron, Cortisol, Testosteron, 17 OH-Progesteron
CYP21-Mangel mit Salzverlust	Mädchen	Ja	Ja	17 OH-Progesteron, Androstendion, Testosteron	Aldosteron, Cortisol
Cyp21-Mangel ohne Salzverlust	Mädchen	Nein	Ja	17 OH-Progesteron, Androstendion, Testosteron	Cortisol
CYP11B1-Mangel	Mädchen	Nein	Ja	Deoxycorticosteron, 11-Desoxycorticosteron	Aldosteron, Cortisol
CYP17-Mangel	Jungen	Nein	Nein	Desoxycorticosteron, Corticosteron	Cortisol, Testosteron
Aldosteronsynthese-Mangel Typ 2	Nein	Ja	Nein	18-OH-Corticosteron	Aldosteron
Aldosteronsynthese-Mangel Typ 1	Nein	Ja	Nein	Desoxycorticosteron, Corticosteron	Aldosteron

als Stresshormon, das Aldosteron zur Regulation des Mineral- und Wasserhaushalts sowie Dehydroepiandrosteron (DHEA) und DHEA-Sulfats (DHEAS), die als Vorläufermetabolite für androgene Steroide und Östrogen dienen. Die Nebennierenrinde besteht aus drei unterschiedlichen Schichten, der Zona glomerulosa, der Zona fasciculata und der Zona reticularis, die als Kompartimente der Mineralocorticoid, der Glucocorticoid und der Androgensynthese dienen. Die Regulation der Cortisol synthese in der Zona fasciculata erfolgt im Wesentlichen durch ACTH. Fünf enzymatische Schritte (Abb. 2) sind ausgehend vom Cholesterin zur Bildung von Cortisol erforderlich. Daneben wird in der Zona fasciculata auch Corticosteron gebildet.

Die Regulation der Aldosteronsynthese in der Zona glomerulosa erfolgt über Kalium-Ionen und Angiotensin II. Die enzymatische Ausstattung der Zona glomerulosa entspricht weitgehend der der Zona fasciculata. Allerdings ist für die Aldosteronsynthese die Aldosteronsynthase (CYP11B2) in diesem Kompartiment von besonderer Bedeutung. Die Zona reticularis setzt DHEA frei, welches in der Peripherie in Testosteron oder Östrogen umgewandelt wird. DHEA selbst hat schwach androgene Wirkung.

Klinik

Einteilung und Symptome

Hormonelle Änderungen

Die genetischen Defekte in den verschiedenen Enzymen der Steroidbiosynthese resultieren typischerweise in

unterschiedlichen Konstellationen von Über- oder Unterproduktion bestimmter Hormone (Tabelle 1). Ein AGS mit Androgenüberproduktion entwickelt sich beim 21-Hydroxylase-Mangel (CYP21) (White, 2000) und beim 11- β -Hydroxylase-Mangel (CYP 11B1) (Peter, 2002). Bei der Lipoidhyperplasie (20,22-Desmolase-Mangel, StAR-Protein) (Stocco 2002), beim 17 α -Hydroxylase-Mangel (CYP17) (Miller, 2004) und beim 3 β -Dehydrogenase-Mangel (HSD3B2) (Simard, 2002) liegt eine CAH mit Androgenmangel vor. Normale Cortisolspiegel sind bei bestimmten Defekten der CYP17 (17,20 Lyase-Mangel) und der Aldosteronsynthase (CYP11B2) (White, 2004) zu erwarten. Defekte im CYP11B1 resultieren in einer erhöhten Desoxycortisol-Produktion, die den Aldosteronmangel kompensiert (kein Salzverlust) und zu einem arteriellen Hypertonus mit möglichen Folgesymptomen wie Linksherzhypertrophie und Retinopathie führen kann (Zhu 2003).

Klassische Formen

Bei den klassischen Formen der CAH sind die wichtigsten Symptome bereits bei der Geburt vorhanden. Androgenexzess führt zur pränatalen Virilisierung bei Mädchen (intersexuelles Genitale, Pseudohermaphroditismus) und einer Pseudopubertas praecox bei beiden Geschlechtern.

Eine verminderte Androgenproduktion führt bei Knaben zu unzureichend virilisiertem Genitale. Verminderte Östrogenproduktion bewirkt bei Mädchen eine Pubertas tarda mit primärer Amenorrhoe. Die verminderte Corti-

solproduktion führt zu Müdigkeit, Apathie, verminderter Stresstoleranz, Hypoglykämien, erhöhter Infektneigung und Addison-ähnlichen Krisen. Die verminderte Aldosteronproduktion resultiert in Hyperkaliämie, Hyponatriämie, Salzverlustsyndrom, metabolischer Azidose und Blutdruckabfall.

Nicht klassische Formen

Je nach Schwere des genetischen Defektes können sich die Symptome bei den nicht klassischen Formen der CAH, die mit Androgenexzess einhergehen, in unterschiedlichem Lebensalter manifestieren. Vor der Pubertät kann sich die Erkrankung bei Mädchen in prämaturner Pubarche oder Adrenarche, akzeleriertem Knochenalter, Kleinwuchs und Klitorishypertrophie manifestieren. Bei erwachsenen Frauen treten Hirsutismus, Akne, Seborrhoe, tiefe Stimme, Klitorishypertrophie, temporärer Haarausfall, Stirnglatze, primäre oder sekundäre Amenorrhoe, Oligomenorrhoe als typische Symptome auf (Forest 2004).

Kongenitale Lipoidhyperplasie (20,22-Desmolase-Mangel, StAR-Protein)

Knaben entwickeln ein phänotypisch weibliches oder intersexuelles Genitale, während Mädchen ein normales Genitale aufweisen. Bei der Geburt sind die Nebennieren massiv vergrößert und mit Einlagerungen von Cholesterinestern durchsetzt, wodurch die Krankheit ihren Namen bekommen hat. Auch wenn unmittelbar nach der Geburt noch Steroidhormonspiegel messbar sind, kommt es ohne Behandlung zu einem kompletten Aus-

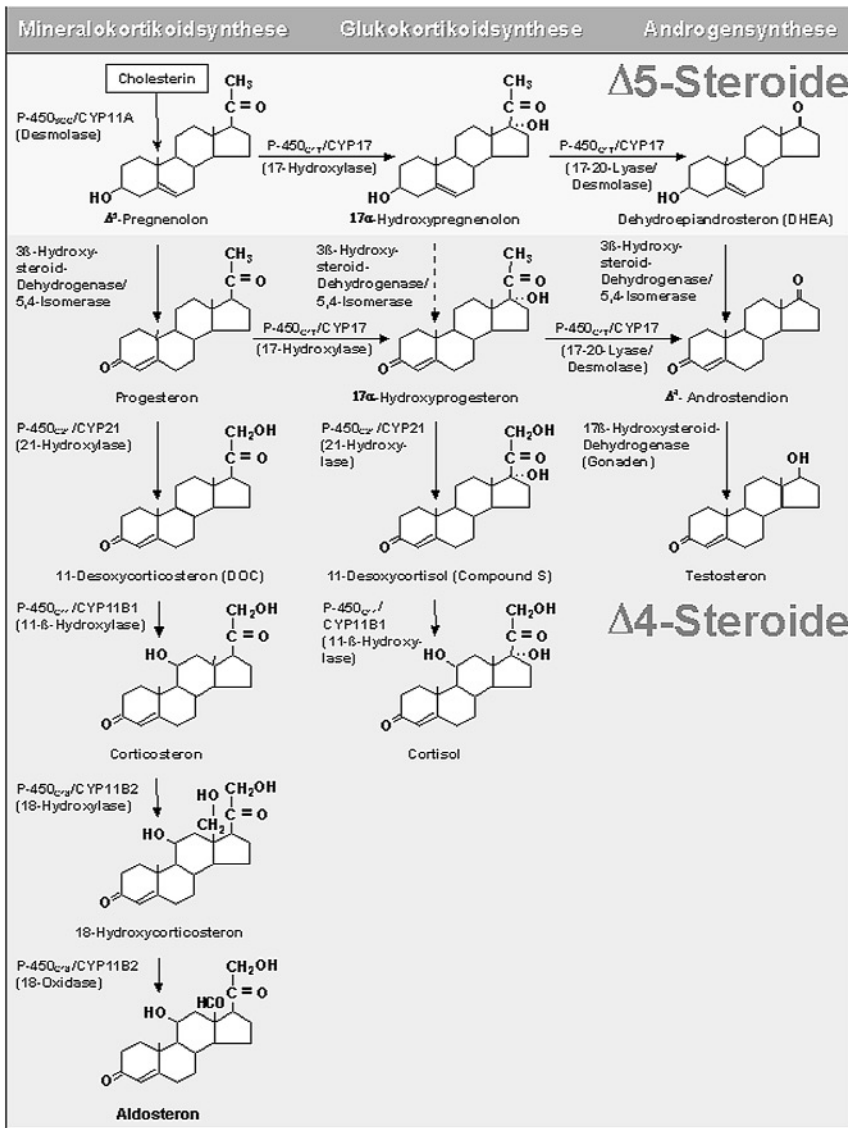


Abb 2 Übersicht der Steroidbiosynthese

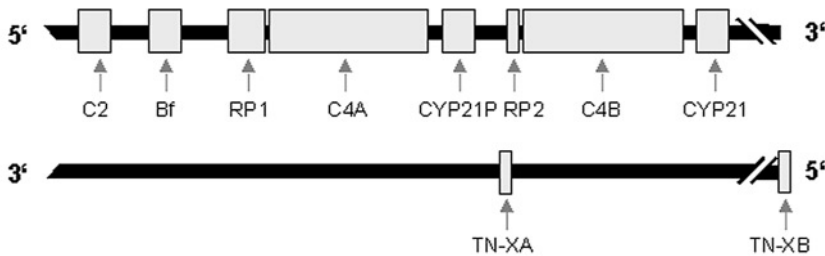


Abb 3 Genlocus des 21-Hydroxylase-Gens (Cyp21) und des Pseudogens (Cyp21P) auf dem langen Arm von Chromosom 6. C2, C4 Komplementfaktoren, Bf Properdinfaktor, RP1 nukleäres Protein mit unbekannter Funktion, RP2 verkürzte Kopie des RP1-Gens, TNX Tenascin X-Gen, A/B Pseudogen /aktives Gen

fall aller Nebennierensteroid- und klinisch zu einer akuten Addison-Krise. Diese Form der CAH ist sehr selten.

17 α -Hydroxylase-/12,20-Lyase-Mangel

Etwa 1% der klassischen Formen der CAH basieren auf Defekten im CYP17-Gen. Patienten mit CYP17-

Mangel können keine Geschlechtshormone bilden. Männliche Neugeborene fallen durch ein intersexuelles Genitale auf. Bei Mädchen bleibt die spontane Pubertätsentwicklung aus, und es besteht ein primäre Amenorrhö. Die Blockade im Stoffwechselweg der Steroidbiosynthese führt zu erhöhten Desoxycortisol- und Corti-

costeron-Konzentrationen. Deren mineralocorticoide Wirkung führt zur Hypertonie, Hyperkaliämie, Hyponatriämie und metabolischer Alkalose. Die Plasma-Renin-Aktivität ist erniedrigt.

3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel

Der schwere HSD3B2-Mangel führt zu einem Cortisol- und Aldosteron-Mangel sowie einer Störung der Testosteronbiosynthese. Klinisch tritt häufig ein schweres Salzverlustsyndrom auf. Männliche Neugeborene weisen aufgrund des Androgen-Mangels ein intersexuelles Genitale auf. Die hohen DHEA-Konzentrationen, die bei diesem Krankheitsbild auftreten, können wegen der leichten Androgenwirkung dieses Metaboliten bei weiblichen Neugeborenen leichte Virilisierungsscheinungen (Klitorishypertrophie) auslösen. Der HSD3B2-Mangel ist für ca. 1% der klassischen Formen der CAH verantwortlich.

Mehrere Autoren diskutieren, dass nicht-klassische Formen des HSD3B2-Mangels wesentlich häufiger vorkommen und die Ursache von präauraler Pubarche, Hirsutismus, Menstruationsstörungen und polycystischen Ovarien sind.

21-Hydroxylasemangel

In über 90% der klassischen Formen des AGS liegt ein CYP21-Mangel vor. Wegen der großen klinischen Relevanz wird in dem vorliegenden Artikel auf diese Form des AGS ausführlicher eingegangen.

Die Inzidenz der klassischen Formen des 21-Hydroxylasemangels wird mit 1:12.000 Geburten bei Kaukasiern angegeben. In einigen ethnischen Gruppen liegt die Häufigkeit jedoch erheblich höher (z.B. 1:700 bei Yupik Eskimos, Alaska).

Die Heterozyotenfrequenz in der deutschen Bevölkerung liegt bei ca. 1:50, was in etwa auch mit anderen europäischen Ländern und Nordamerika übereinstimmt. Die Häufigkeit nicht-klassischer Formen dürfte ca. bei 1:350 liegen, wobei davon auszugehen ist, dass dieses Krankheitsbild unterdiagnostiziert ist.

Der CYP21-Mangel kann sich in drei Formen manifestieren.

- Klassisches einfach virilisierendes AGS
- Klassisches AGS mit Salzverlustsyndrom
- Nicht-klassisches (late-onset) AGS

Beim *klassischen einfach virilisierenden* AGS treten bereits in utero Virilisierungen bei weiblichen Feten auf. Das äußere Genitale kann dabei je nach Schweregrad des Enzymdefektes von einer einfachen Klitorishypertrophie bis zu einer kompletten Fusion der Labioskrotalfalten mit einer penisartigen Vergrößerung der Klitoris und Extension der Urethra auf die Glans penis reichen. Die Klassifizierung der Missbildung erfolgt nach Prader. Das innere Genitale ist immer weiblich. Weibliche Neugeborene können bei der Geburt als Knaben verkannt werden. Das Genitale männlicher Neugeborener ist bis auf gelegentliche Pigmentierung des Skrotums unauffällig.

Ohne Behandlung manifestiert sich bei den AGS-Kindern beiderlei Geschlechts eine Pseudopubertas praecox mit frühem Auftreten von Pubesbehaarung und Penis- bzw. Klitorishypertrophie. Der Androgenüberschuss führt zunächst zu einem akzelerierten Knochenwachstum, dann aber zu einem vorzeitigen Schluss der Wachstumsfugen, so dass insgesamt ein Kleinwuchs resultiert. Nicht behandelte AGS-Mädchen bleiben primär amenorrhöisch.

Das *klassische AGS mit Salzverlust* tritt auf, wenn ein (nahezu) kompletter Verlust der CYP21-Aktivität vorliegt. Zu den Virilisierungserscheinungen kommt ein lebensbedrohendes Salzverlustsyndrom hinzu. Dieses manifestiert sich in der Regel erst in der zweiten bis dritten Lebenswoche durch Trinkschwäche, Erbrechen, Elektrolytveränderungen, Exsikkose, metabolische Azidose und zunehmende Apathie. Bei nicht rechtzeitig angepasster Behandlung kann auch in späterem Lebensalter unter akuten Stress-Situationen (Infektionen, Fieber, Gastroenteritis, Operationen) eine Salzverlustkrise auftreten.

Das *nicht-klassische AGS* kann sich sehr variabel manifestieren. Schwere Formen führen bereits in der Jugend zu prämaturer Pubarche, Großwuchs und Klitorishypertrophie. Mildere Formen werden meist nur bei weiblichen Genträgern manifest. Betroffene Männer mit entsprechender genetischer Veranlagung entwickeln nur selten klinische Symptome. Bei erwachsenen Frauen führen die Auswirkungen der Hyperandrogenämie zu Symptomen wie Hirsutismus, Akne, Seborrhoe, tiefe Stimme, leichte Klitorishypertrophie, temporärem Haar ausfall, Stirnglatze, primäre oder sekundäre Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe. Von Bedeutung ist die differentialdiagnostische Abgrenzung der milden nicht-klassischen Form des CYP21-Mangels vom Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCO).

11 β -Hydroxylase-Mangel

Etwa 5% der klassischen Formen des AGS werden durch einen CYP11B1-Mangel hervorgerufen. Diese Form der adrenalen Hyperplasie zeichnet sich durch einen Androgen- und Mineralocorticoid-Exzess aus. Mädchen werden mit einem intersexuellen äußeren Genitale geboren. Bei betroffenen Jungen entwickelt sich eine Pseudopubertas praecox. Das vermehrt gebildete Desoxycorticosteron hat mineralocorticoid Wirkung und kompensiert den Aldosteron-Mangel. Es kommt meist in den ersten Lebensjahren zu einer arteriellen Hypertonie in dessen Folge sich später eine Linksherzhypertrophie und/oder Retinopathie entwickeln kann. Da die Vi-

rilisierungssymptomatik sich von der des CYP21-Mangels kaum unterscheidet, die Hypertonie aber behandlungsbedürftig ist, ist eine differentialdiagnostische Klärung sehr wichtig. Neben der schweren klassischen Form des CYP11B1-Mangels werden ähnlich dem CYP21-Mangel auch nicht-klassische Formen postuliert.

Aldosteronsynthese-Mangel

Ein Hypoaldosteronismus bei normalem Cortisol- und Androgen-Spiegeln wird durch einen Mangel des Enzyms 11 β -Hydroxylase Typ B2 (CYP11B2) hervorgerufen. Dieses Enzym wird für die letzten beiden Schritte der Aldosteron-Synthese aus Desoxycorticosteron (Abb. 2) benötigt. Neugeborene mit diesem Defekt erkranken in den ersten Lebenswochen an einer lebensbedrohlichen Salzverlustkrise, rezidivierendem Erbrechen und Geidehstörungen. Mit zunehmendem Alter nimmt die Schwere der Erkrankung ab und ist im Erwachsenenalter häufig auch ohne Behandlung asymptomatisch. Dieses Krankheitsbild ist selten. Lediglich in bestimmten Bevölkerungsgruppen tritt aufgrund konsanguiner Ehen eine gewisse Häufung auf.

Molekulargenetik des AGS

20,22 Desmolase, StAR-Protein

Bei diesem Defekt ist die Abspaltung der Seitenkette zwischen C20 und C22 des Cholesterins gestört, die zu Pregnenolon führt. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Side-Chain-Cleavage-Enzym (P450scc). Bei keinem der Patienten mit Lipoid Hyperplasie wurden jedoch Mutationen im Gen für dieses Enzym gefunden. 1995 wurden Mutationen im Gen für das StAR-Protein (Steroidogenic acute regulatory protein) nachgewiesen, das für den Cholesterintransport zur äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich ist. Dieses Protein scheint so essentiell für den ersten Schritt der Steroidhormonbiosynthese zu sein, dass inaktivierende Mutationen das Krankheitsbild auslösen. Das StAR-Gen ist auf Chromosom 8 (8p11.2) lokalisiert und besteht aus 7 Exons. Als pathogene Mutationen werden Missense- und Nonsense-Mutationen sowie kleinere Deletionen und Insertio-

nen bei Patienten mit congenitaler Lipoidhyperplasie nachgewiesen.

17 α -Hydroxylase/17,20-Lyase (CYP17)

Das Enzym CYP17 ist ein Protein mit zwei katalytischen Aktivitäten. Es besitzt sowohl 17 α -Hydroxylase-Aktivität als auch 17,20-Lyase-Aktivität und kann damit sowohl die 17 α -Hydroxylierung von Pregnenolon und Progesteron zu 17 α -Hydroxypregnenolon und 17 α -Hydroxyprogesteron katalysieren als auch deren weitere Umwandlung zu DHEA bzw. Androstendion (Abb. 2) durch die 17,20-Lyase-Aktivität. Die meisten Defekte in diesem Gen verhindern die Hydroxylierung an C17 und die 17,20-Lyase-Aktivität. Damit ist die Synthese der Vorstufen des Cortisols und des DHEA und Androstendion blockiert. Weder Cortisol noch Testosteron und Östrogen können gebildet werden. In seltenen Fällen ist aber auch nur die 17,20-Lyase-Aktivität durch die Mutationen beeinträchtigt, so dass normale Cortisolspiegel bei Testosteron und Östrogenmangel vorliegen. Das CYP17-Gen ist auf Chromosom 10 (10q24.3) lokalisiert und besteht aus acht Exons. In allen Exons können pathogene Mutationen vorkommen.

3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (HSD3B2)

Die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist als Schlüsselenzym sowohl für die Mineralocorticoide, das Cortisol als auch für die Synthese der Geschlechtshormone notwendig. Es hat Isomerase-Eigenschaften und kann die Reaktion in beide Richtungen katalysieren. Es gibt zwei Gene, die Enzyme mit 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität kodieren: HSD3B1, das in der Plazenta, Haut und Fettgewebe exprimiert wird und HSD3B2, das in der Nebenniere und den Gonaden aktiv ist und in dem inaktivierende Mutationen zum AGS führen können. Das HSD3B2-Gen ist auf Chromosom 1 (1p13.1) lokalisiert und besteht aus vier Exons, von denen jedoch nur drei für das Protein kodieren. Krankheitsauslösende Mutationen können in allen kodierenden Exons vorkommen.

21-Hydroxylase-Mangel (Cyp21)

Das Cyp21-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.3) mitten im Genort für den HLA-Histokompatibilitätskomplex und den Komplementfaktor C4 lokalisiert (Abb. 3). Seine Struktur ist vollständig aufgeklärt. Neben dem aktiven Gen befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft (Abstand ca. 30 kB) ein Pseudogen sowohl für das CYP21-Gen (Cyp21P) als auch für das Gen des Komplementfaktors C4 (C4A). Beide sind wahrscheinlich in der frühen Entwicklungsgeschichte des Menschen durch eine Duplikation gemeinsam entstanden und dann durch die Akkumulation von Mutationen inaktiv geworden. Die Sequenzhomologie zwischen aktivem Gen und Pseudogen beträgt im Bereich der Exons 98%. Das CYP21-Gen besteht aus 10 Exons und hat eine Größe von 3,1 kB.

Die Anwesenheit der Pseudogene in unmittelbarer Nachbarschaft der aktiven Gene und die hohe Sequenzhomologie ist der Grund für die Häufigkeit von inaktivierenden Mutationen im CYP21-Gen. Zwei Mechanismen sind für pathogene Veränderungen verantwortlich:

- 1) In etwa 20–25% der klassischen AGS-Fälle liegt eine Deletion von ca. 30 kb des Cyp21 und C4-Gens vor. Diese Art von Mutation entsteht wahrscheinlich durch ein ungleiches Crossing-over während der Meiose. Der Bruchpunkt liegt in der Regel irgendwo zwischen Exon 3 und 8 des Cyp21 und überspannt den Bereich des Cyp21- und C4-Gens bis zur entsprechenden Stelle im Cyp21P.
- 2) Bei 75% liegen eine oder mehrere Mutationen vor, die durch Genkonversionen aus dem Pseudogen stammen (Tusié-Luna 1995).

Die verschiedenen aus dem Pseudogen stammenden Mutationen sind biochemisch danach charakterisiert, wie viel enzymatische Restaktivität noch vorliegt. Daraus lassen sich Regeln für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ableiten (Abb. 1).

Mutationen, die dazu führen, dass kein aktives Enzym gebildet werden kann, führen in homozygoter Form zur

schweren Form des AGS mit Salzverlust (SW: salt wasting). Eine Restaktivität von 2–4% reicht aus, genügend Aldosteron zu bilden, um ein Salzverlustsyndrom zu verhindern. Solche Mutationen führen in homozygotem Zustand phänotypisch zu einer einfach virilisierenden Formen (SV: simple virilizing) des AGS. Mutationen, bei denen im Protein noch deutlich enzymatische Restaktivität vorhanden ist, lassen in homozygotem Zustand ein nicht-klassisches AGS (NC: non-classical AGS) erwarten (Abb. 1).

Bei gemischt heterozygoten Genträgern gilt die Regel, dass sich der Phänotyp nach der milderen Mutation, also nach dem Allel richtet, welches zu einem Enzym mit höherer Restaktivität führt.

11 β -Hydroxylase (CYP11B1, CYP11B2)

Die CYP11 katalysiert die Umwandlung von 11-Desoxycortisol in Cortisol aber auch die Umwandlung von Desoxycorticosteron (DOC) in Corticosteron. Es wurden zwei Gene entdeckt, die für Enzyme mit CYP11-Aktivität kodieren. Zunächst wurde das Gen auf Chromosom 8 (8q21) lokalisiert (CYP11B1). Es hat eine Größe von ca. 7 kB und besteht aus neun Exons. Später wurde ein homologes Gen kloniert, das in unmittelbarer Nähe auf Chromosom 8 (8q21) lokalisiert ist. Es unterscheidet sich vom Isoenzym CYP11B1 dadurch, dass neben der 11-Hydroxylase-Aktivität zusätzlich eine 18-Oxidase-Aktivität vorhanden ist und 11-Desoxycorticosteron zunächst zu Corticosteron und dann weiter zu Aldosteron umgewandelt werden kann. Die Größe beider Gene ist nahezu identisch und es besteht in den kodierenden Bereichen eine Homologie von 95%.

Molekulare Diagnostik des AGS

Da für alle Varianten des AGS die verursachenden Gene vollständig bekannt sind, kann im Prinzip jede Form bei entsprechendem klinischen und biochemischem Verdacht durch eine molekulare Diagnostik überprüft und bestätigt werden. Dabei wird in der Regel eine komplette Sequenzierung des jeweiligen Gens notwendig sein, da es bis auf wenige Ausnahmen kei-

ne häufigen Mutationen gibt. Ausnahmen stellen abgeschlossene umschriebene Bevölkerungsgruppen dar, in denen einzelne Mutationen durch Konsanguinität eine starke Verbreitung haben. Eine weitere Ausnahme ist das CYP21-Gen, bei dem über 90% der vorkommenden Mutationen aus dem Pseudogen (CYP21P) stammen. In den kodierenden Regionen des CYP21P-Gens liegen insgesamt 13 Sequenzabweichungen vom aktiven Gen vor, die zu einer kompletten oder teilweisen Aktivitätsminderung führen und pathogenetisch von Bedeutung sind. Die Verteilung der Mutationen im Gen führt dazu, dass de facto eine komplette Sequenzierung notwendig ist.

Bei der molekularen Diagnostik ist zu beachten, dass die meisten Enzyme der Steroidbiosynthese zur Familie der Cytochrom-P450-Oxidasen gehören und daher verwandte Gene mit hoher Sequenzhomologie existieren. Für mehrere Enzyme gibt es Isoenzyme, deren Gene ebenfalls weitgehend homolog sind, und für das StAR-Gen und das CYP21-Gen existieren Pseudogene mit Homologien über 95%. Beim Aufbau von molekulargenetischen Tests basierend auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) muss daher besonders auf die Spezifität der Amplifikationsreaktionen geachtet werden.

In der klinischen Routine spielt der molekulargenetische Nachweis des CYP21-Mangels wegen der großen Häufigkeit, der teilweise schwierigen Diagnostik über klinische und biochemische Parameter und nicht zuletzt wegen der therapeutischen Konsequenzen, insbesondere der pränatalen Therapie, die mit Abstand wichtigste Rolle.

Molekulare Diagnostik des CYP21-Mangels

Die verschiedenen Arten von möglichen Mutationen und die Anwesenheit des Pseudogens (CYP21P) mit hoher Sequenzhomologie ($\approx 98\%$) zum aktiven Gen (CYP21) machen die molekulare Diagnostik des CYP21-Mangels recht kompliziert.

Nachweis von Deletionen, Duplikationen und Hybridgenen des CYP21

Um komplette oder partielle Deletionen oder Duplikationen des aktiven Gens bzw. Pseudogens zu erfassen, ist eine quantitative PCR oder eine Southern-Blot-Analyse notwendig. Für die quantitative PCR müssen die verwendeten Oligonukleotid-Primer sowohl im Pseudo- als auch im aktiven Gen binden. Die Amplifikate müssen aber bezüglich ihrer Herkunft unterscheidbar sein, d.h. z.B. in der Größe differieren, um die Relation von aktivem Gen zu Pseudogen abschätzen zu können. Damit auch partielle Deletionen bzw. Hybridgene zu erfassen, ist es notwendig, an zwei bis drei Positionen PCR-Primer zu positionieren.

Sequenzanalyse des CYP21

Zum Nachweis von Punktmutationen oder kleineren Genkonversionen durch DNA-Sequenzierung müssen PCR-Primer spezifisch im aktiven Gen binden. Aus den für das CYP21-Gen spezifischen Amplifikaten kann dann eine direkte Sequenzierung erfolgen. Dabei sind die Primerpositionen sehr sorgfältig auszuwählen, da neben den pathologisch relevanten Mutationen auch eine Reihe von funktionell nicht relevanten Mutationen aus dem Pseudogen ("Polymorphismen") im aktiven Gen vorkommen können und das Hybridisieren der Primer verhindern könnte. Wegen des Auftretens von Hybridgenen zwischen aktivem Gen und Pseudogen und der Möglichkeit partieller Deletionen, kann es passieren, dass ein solches defektes Allel nicht amplifiziert wird und die Sequenzierung des vorhandenen intakten Allels zu dem Schluss führt, dass beide Genkopien vorhanden sind. Es lägen dann alle polymorphen Stellen in diesem Bereich anscheinend homozygot vor, obwohl es sich in Wirklichkeit um eine "hemizygote" Sequenz handelt und der Patient heterozygoter Anlageträger für AGS ist. Es ist daher sinnvoll, mit mehreren überlappenden PCR-Fragmenten und unter Zuhilfenahme des Ergebnisses der quantitativen PCR eine Abschätzung der vorhandenen Verhältnisse vorzunehmen.

Indikationen für die molekulare Diagnostik des 21-Hydroxylase-Mangels

Neugeborenencreening

In der Vergangenheit wurden Familien, in denen die Eltern heterozygote Anlageträger für AGS sind, meist erst durch die Geburt eines betroffenen Kindes entdeckt.

Werden Mädchen mit intersexuellem Genitale geboren, so ist die Verdachtsdiagnose zunächst der CYP21-Mangel, da dieses mit Abstand die häufigste Ursache ist (Therell 2001). Männliche Neugeborene fallen in der Regel nur auf, wenn es zu Gedeihstörungen im Rahmen eines Salzverlustsyndroms kommt. Gelegentlich liegt eine Pigmentierung des Scrotums vor. Man kann davon ausgehen, dass in der Vergangenheit hinter manch einem plötzlichen Kindstod von Knaben ein nicht erkanntes AGS mit Salzverlust steckte. Bis vor wenigen Jahren war man davon ausgegangen, dass Mädchen und Knaben im Verhältnis 3:1 betroffen sind. Tatsächlich gibt es keine Geschlechtspräferenz für den CYP21-Mangel.

Es wird daher heute ein flächendeckendes Neugeborenencreening gefordert, um Betroffene in den ersten Lebenstagen zu erkennen und rechtzeitig zu substituieren. Als Parameter dient zunächst das basale 17-Hydroxyprogesteron, das aus den getrockneten Blutropfen der für das Neugeborenen-Screening verwendeten Guthrie-Karten bestimmt werden kann. Bei erhöhten Werten ist sofort eine zweite Bestimmung aus Blut erforderlich und bei weiterhin erhöhten Werten eine molekularbiologische Abklärung indiziert. Wenn es sich nicht um einen CYP21-Mangel handelt, kann durch die Hormonprofile im Plasma und Urin eine weitere Einengung des Enzymdefektes erfolgen.

Beim CYP21-Mangel ist vor allem wichtig, dass man aus der Kenntnis der vorliegenden Mutationen abschätzen kann, ob es zu einem Salzverlust kommen wird. Für diesen Fall würde zusätzlich zum Hydrocortison eine Substitution mit Fluorocortison (Astonin H) durchgeführt. Das molekulargenetische Ergebnis ist gleich-

zeitig Grundlage für eine genetische Beratung des Paares und der Abschätzung des Wiederholungsrisikos bei weiteren Schwangerschaften.

Pränatalscreening und -therapie

Haben Eltern bereits ein Kind mit AGS oder ist aus anderen Gründen bekannt, dass beide Eltern Träger von Mutationen im CYP21-Gen sind, ist eine humangenetische Beratung bei Kinderwunsch in Hinblick auf eine pränatale Diagnostik und Therapie indiziert. Tragen beide Eltern Mutationen im CYP21-Gen, die zu einem einfach virilisierenden AGS oder zu einem AGS mit Salzverlust führen können (Abb 1), sollte mit Bekanntwerden der Schwangerschaft Dexamethason als plazentagängiges Cortisolderivat gegeben werden. Die Synthese von androgenen Steroiden im Feten wird dadurch supprimiert. Diese Behandlung muss vor der 6. Schwangerschaftswoche beginnen, da zu diesem Zeitpunkt die Geschlechtsdifferenzierung des Urogenitalsystems begonnen hat. In der 10.–12. Schwangerschaftswoche sollte aus einer Chorionzottenbiopsie das Geschlecht des Feten und der Genotyp bezüglich der Mutationen im CYP21-Gen bestimmt werden. Nur bei weiblichen Feten, die homozygot oder gemischt heterozygot für die AGS-Mutationen sind, ist die Fortführung der Dexamethason-Behandlung bis zum Ende der Schwangerschaft indiziert. Andernfalls ist zur Vermeidung von Nebenwirkungen bei der Mutter die Behandlung abzubrechen (New 2001).

Molekulare Diagnostik bei nicht-klassischem AGS im Kindesalter

Pseudopubertas praecox ist die auffälligste Manifestation des nicht-klassischen AGS bei Mädchen und Knaben. Hinzu kommt das akzelerierte Knochenalter und zunächst beschleunigte Längenwachstum. Bei entsprechendem Verdacht sollte das Kind einem pädiatrischen Endokrinologen vorgestellt werden. Nach biochemischer Bestätigung über einen ACTH-Test und Ermittlung des Profils der Steroidhormone sollte gezielt eine molekulargenetische Bestätigung erfolgen. Das Ergebnis hat Einfluss auf die Therapiewahl (z.B. Cortisol oder Antiandrogene je nach Schwere der

Mutationen) und dient als Grundlage für die genetische Beratung der Familie.

Molekulare Diagnostik bei nicht-klassischem AGS bei erwachsene Frauen

In der Gynäkologie ergibt sich der Verdacht auf ein nicht-klassisches AGS bei der differentialdiagnostischen Abklärung von Hyperandrogenämien. Bei Hirsutismus, Akne, Seborrhoe, tiefer Stimme, Klitorishypertrophie, temporärem Haarausfall, Stirnglatze, primärer oder sekundärer Amenorrhoe oder Oligomenorrhoe muss auch ein nicht-klassisches AGS in Erwägung gezogen werden. Ursache können gemischt heterozygote milde Mutationen oder Heterozygotie für schwerwiegende Mutationen im 21-Hydroxylase-Gen sein; in seltenen Fällen auch im HSD3B- oder im CYP11B1-Gen. Da die basalen 17OHP-Werte oft nicht aussagekräftig sind, sollte in der frühen Follikelphase ein ACTH-Test erfolgen. Bei pathologischem Anstieg des 17OHP ($\geq 2,6$ ng/ml) ist eine molekulargenetische Bestätigung indiziert. Die Bedeutung der molekulargenetischen Bestätigung liegt nicht so sehr in der Therapieentscheidung, die zumeist ohnehin empirisch erfolgt, sondern in der Tatsache, dass bisher nicht bekannte Anlageträgerinnen von CYP21-Mutationen erkannt werden und im Rahmen einer humangenetischen Beratung darauf hingewiesen werden können, dass wegen der hohen Frequenz heterozygoter Genträger bei einem Kinderwunsch der Genträgerstatus des Partners überprüft werden sollte und gegebenenfalls die Möglichkeit einer pränatalen Diagnostik und Therapie besteht. Da man davon ausgehen kann, dass viele Frauen mit Mutationen im CYP21-Gen im Laufe ihres Lebens gynäkologisch-endokrinologische Probleme bekommen, besteht in der Erfassung dieser Fälle die Chance die unerwartet auftretenden AGS-Fälle bei Neugeborenen deutlich zu reduzieren.

Literatur

Forest MG, Nicolino M, David M, Morel Y (2004) The virilized female: endocrine background BJU Int. 93 Suppl 3:35-43

Miller WL (2004) Steroid 17alpha-hydroxylase deficiency – not rare everywhere. J Clin Endocrinol Metab. 89:40-2

New MI (2001) Antenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. Curr Urol Rep. 2:11-8

Peter M (2002) Congenital adrenal hyperplasia: 11beta-hydroxylase deficiency. Semin Reprod Med. 20:249-254

Simard J, Moisan AM, Morel Y (2002) Congenital adrenal hyperplasia due to 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4) isomerase deficiency. Semin Reprod Med. 20:255-76

Stocco DM (2002) Clinical disorders associated with abnormal cholesterol transport: mutations in the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Cell Endocrinol. 191:19-25

Thereill BL (2001) Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (2001) Endocrinol Metabol Clin North Am. 30:15-30

Tusié-Luna MT, White PC (1995) Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and (CYP21P involve different mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA 92:10796-10800

White PC (2004) Aldosterone deficiency and related disorders. Mol Cell Endocrinol. 217:81-7

White PC, Speiser PW (2000) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. Endocrine Reviews 21:245-291

Zhu YS, Cordero JJ, Cai LQ, Herrera C, DeFillo-Ricart M, Shackleton C, Imperato-McGinley J (2003) Am J Med Genet. 122A:193-200

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Höppner
Labor für Molekulare Genetik
Bioglobe GmbH
Grandweg 64
22529 Hamburg
Tel. 040-460693-13
Fax 040-460693-10
hoepfner@bioglobe.net