Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im
Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Prämature Pubarche — ACTH-Test und Mutationsanalyse des 21-Hydroxylasegens

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Daniela Schenk
aus Roth
2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. P. Schwarz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. M. Vogeser
	Prof. Dr. K. Parhofer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. N. Krone
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	21.04.2005

Danksagung

Ich möchte allen von Herzen danken, die das Zustandekommen meiner Arbeit ermöglicht haben:

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Schwarz für die Überlassung des Themas, seine Begeisterung für diese Arbeit, die grosse Geduld und Hilfe, die in keiner Weise selbstverständlich ist.
Herrn Dr. med. Nils Krone für die Einführung in das geheimnisvolle Wesen der PCR und die Mitbetreuung der Patienten.
Frau Dr. med. Susanne Bechthold für die Einweisung in die Knochendichtemessung und die jederzeit bereitwillige Hilfe.
Herrn Professor Dr. med. E. Albert für das Interesse an der Studie und Frau Dr. rer. nat. Elisabeth Keller die schnelle Durchführung der RFLPs und Oligos.
Frau Renate Hövel und Frau Amalie Busch für die Durchführung der Hormonbestimmungen und die netten Kaffeerunden.
Herrn Dr. rer. nat. Michael Wiseman für die statistische Beratung.
Meinen Freunden Dr. rer. nat. Stefan Massonet und Ulrike Massonet für die Hilfe bei den Abbildungen und die mühselige Korrektur.
Meinen Lieblingskommilitonen Dr. rer. nat. Felix Joachimski und Dipl. biol. Anne Ostendorf für den gemeinsamen Kampf gegen die Tücken der Formatierung und für die Freude an der Medizin, die wir miteinander haben.
Meinem Mann Detlef für seine beständige Liebe und Unterstützung.
Meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich in jeder erdenklichen Weise unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Definition der Prämaturen Pubarche 1
1.2 Physiologie der Adrenarche 2
1.3 Prämature Adrenarche 5
1.4 Genetik des 21-Hydroxylase-Mangels 6
1.5 Historischer Überblick über die Forschung zur Prämaturen Pubarche 8
1.6 Aktueller Stand der Forschung 24

2 Fragestellung 27

2.1 Wieviele der Patienten mit Prämaturer Pubarche sind tatsächlich heterozygote Carrier für CYP21-Mutationen? 27
2.2 Wie verlässlich ist der ACTH-Test in der Diagnostik der Heterozygotie? 27
2.3 Inwieweit unterscheiden sich Patienten mit normalem ACTH-Test von denjenigen mit gesteigerter 17-OHP-Antwort? 28
2.4 Welche Auffälligkeiten zeigt unsere Patientengruppe? 28

3 Patienten und Methoden 29

3.1 Patientenrekrutierung 29
3.2 Anamnese 29
3.3 Körperliche Untersuchung 30
3.4 Apparative Untersuchungen 31
3.5 Labor 33
3.6 Material und Methoden der DNA-Analyse 35
3.7 Statistische Methoden 45

4 Ergebnisse 47

4.1 Definition der zwei Gruppen 47
4.2 Anamnestische Daten 47
4.3 Körperliche Untersuchungsbefunde 50
4.4 Apparative Untersuchungsergebnisse 52
4.5 Labor 54
4.6 Ergebnisse der DNA-Analyse 63

5 Diskussion 67

5.1 Bestimmung der Heterozygotenhäufigkeit 67
5.2 Bedeutung des ACTH-Tests bei Prämaturer Pubarche 67
5.3 Vergleich der beiden Gruppen mit normalem und abnormem 17-OHP-Anstieg 69
5.4 Auffälligkeiten unserer Patientengruppe 71

6 Zusammenfassung 81

Literaturverzeichnis 83

Anhang – Originaldaten 93

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AP	Alkalische Phosphatase
B	*Breast* = Brustentwicklung
BA	*Bone age* = Knochenalter
BMI	*Body mass Index*
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CA	*chronological age* = chronologisches Alter
CAH	*congenital adrenal hyperplasia* = Adrenogenitales Syndrom
CYP21	21-Hydroxylasegen
CYP21P	21-Hydroxylasepseudogen
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
Δ	Delta = Differenz
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DHAS	Dehydroepiandrosteron-Sulfat
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Desoxycorticosteron
dTTP	Desoxythymintriphosphat
DXA	*Dual x-ray absorption*
EASIA	*Enzyme amplified sensitivity immuno assay*
EDTA	*ethylene diamine tetraacetic acid* = Äthylendiamintetraessigsäure
Ex	Exon
FAE	funktioneller Androgenexzess
FOH	Funktioneller ovarieller Hyperandrogenismus
FPIA	Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassay
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fT4	freies Thyroxin
G	*Genitals* = Genitalentwicklung <u>oder</u> Guanin
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormon
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase = Aspartataminotransferase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase = Alaninaminotransferase
HbA_{1c}	glykosyliertes Hämoglobin A_1
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IGF	*Insulin-like growth factor*, syn. Somatomedin
IGFBP	*Insulin-like growth factor-binding proteins*
In	Intron
kb	Kilobasen
Leu	Leucin
LH	Luteinisierendes Hormon
LHRH	Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon
MSI	mittlerer Seruminsulin-Spiegel

n	Anzahl
NC-CAH	*Non-classical-congenital adrenal hyperplasia* = nicht-klassisches AGS
OD_{260}	optische Dichte bei 260 nm
17-OHP	17-Hydroxyprogesteron
21-OH	21-Hydroxylase
PCOS	*Polycystic ovary syndrome* = Syndrom der Polyzystischen Ovarien
PCR	*Polymerase chain raction* = Polymerasekettenreaktion
PH	*Pubic hair* = Pubesbehaarung
pQCT	periphere quantitative Computertomographie
Pro	Prolin
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen
RIA	Radioimmunoassay
RR	Riva Rocci
SD	Standardabweichung(en)
SDS	*Standard deviation score* oder *Sodium Dodecyl Sulfate*
Ser	Serin
SGA	*small for gestational age* = Mangelgeburt
SSW	Schwangerschaftswoche
SV	*simple virilizing* = einfach virilisierend
SW	*salt wasting* = salzverlierend
T	Thymin
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett
Val	Valin
VK	Variationskoeffizient
VLDL	*very low density lipoproteins*
x	Mittelwert

1 Einleitung

1.1 Definition der Prämaturen Pubarche

Der klinisch-deskriptive Begriff Pubarche bezeichnet das Auftreten von Pubesbehaarung, die von Axillarbehaarung begleitet sein kann. Dieser Prozess wird als prämatur betrachtet, wenn er bei Mädchen vor dem achten, bei Jungen vor dem neunten Lebensjahr auftritt (27). Im Durchschnitt tritt das Stadium PH2 nach *Marshall und Tanner* (51) im Alter von 11,69 $\pm$ 1,21 Jahren auf. In der normalen Pubertätsentwicklung steht die Pubarche bei Mädchen in zeitlichem Zusammenhang mit der Brustentwicklung, der Umwandlung der Vaginalschleimhaut und der Menarche, bei Jungen mit der Entwicklung von Penis, Skrotum und Testes, sowie bei beiden Geschlechtern mit dem pubertären Wachstumsspurt (51, 34). Die meisten Autoren unterscheiden zwischen typischer und atypischer Prämaturer Pubarche. Bei der typischen können neben der Pubesbehaarung auch Axillarbehaarung und adulter Schweissgeruch vorliegen. Unterschiedliche Meinungen herrschen bezüglich der Frage, ob leichte zystische Akne oder fettendes Kopfhaar als atypisch anzusehen ist. Eine sicher atypische Form liegt bei Vergrösserung der Klitoris, der kleinen Labien bzw. des Penis vor (2, 73). Das Hodenvolumen bei Jungen bzw. die Brustdrüsen bei Mädchen sind definitionsgemäss präpubertär (73). Ein leichter Knochenaltervorsprung findet sich sehr oft. Die Prämature Pubarche tritt normalerweise zwischen dem dritten und achten Lebensjahr auf, bei Mädchen häufiger als bei Jungen (73). Die isolierte Prämature Pubarche ist neben der Prämaturen Thelarche, der vorzeitigen Brustentwicklung, die häufigste Form eines verfrühten Auftretens von Pubertätsmerkmalen (70, 63). Es findet sich zumeist dunkles, kräftiges und gelegentlich gekräuseltes Haar, bei Mädchen auf den Labia majora oder zusätzlich auf dem Mons pubis, bei Jungen an der Penisbasis. Der Befund ist bei den Kindern entweder stationär oder nur langsam progredient (63).
Das Auftreten von Pubesbehaarung geschieht durch Stimulation der androgensensitiven Haarfollikel. (71)
Der Pubarche liegt die Reifung der Nebennierenrinde, Adrenarche genannt, zugrunde.
Die meisten Kinder mit Prämaturer Pubarche zeigen erhöhte Serum-Spiegel an basalem Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteron-Sulfat (DHAS), Androstendion und in einigen Studien auch Testosteron. Die Androgen-Spiegel sind durch Administration von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) zu stimulieren, durch Dexamethason zu supprimieren, was auf eine adrenale Herkunft schliessen lässt. Der Serum-Spiegel des Luteinisie-

renden Hormons (LH) und die LH-Antwort auf Stimulation mit Luteinisierendes-Hormon-Releasing-Hormon (LHRH) werden dagegen als normal beschrieben. (63)

1.2 Physiologie der Adrenarche

Die Nebenniere ist als paarige endokrine Drüse am oberen Pol der Nieren lokalisiert. Die Rinde ist mesodermaler Herkunft, nach Anordnung der Zellen lassen sich histologisch drei fliessend ineinander übergehende Zonen erkennen. Die schmale äussere Zona glomerulosa besteht aus Zellballen und knäuelartig gewundenen Zellsträngen, hier werden vor allem Mineralocorticoide gebildet. Im breiten mittleren Rindenabschnitt, der Zona fasciculata, sind grosse polygonale helle Zellen, die hauptsächlich Glucocorticoide bilden, zu radiären Strängen angeordnet. Netzförmig verbundene Zellen, die Androgene sezernieren, sind in der innen gelegenen Zona reticularis zu finden. (66)

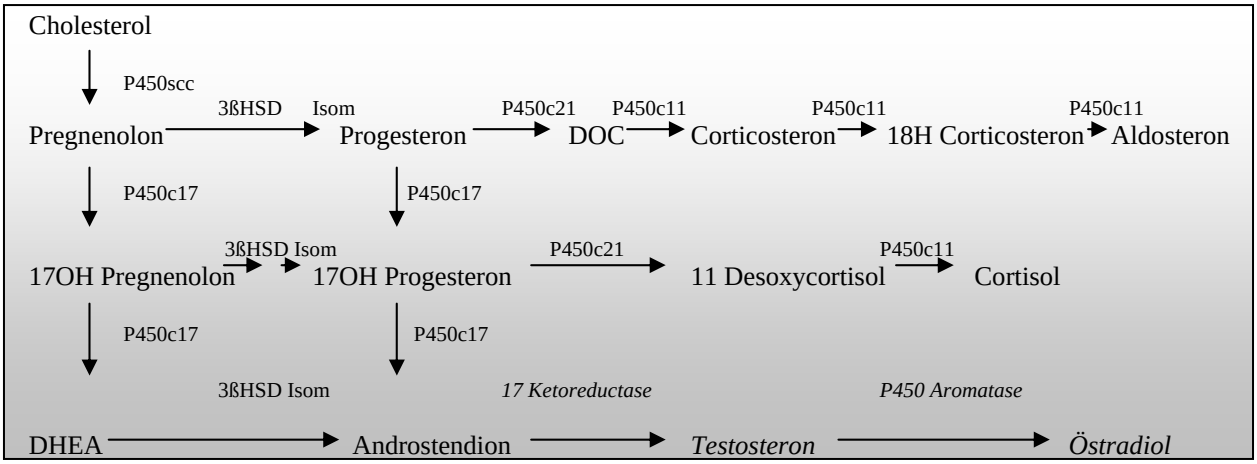
Eine Zona reticularis wird erst ab einem Alter von vier Jahren histologisch sichtbar. (12)

In die Steroidgenese sind vier P450-Enzyme involviert, die entsprechenden Gene sind in Klammern aufgeführt: das mitochondriale P450scc mit 20,22-Desmolase-Aktivität (CYP11A). Das ebenfalls mitochondriale P450c11 mit 11-Hydroxylase-, 18-Hydroxylase- und 18-Methyloxydase-Aktivität (CYP11B). Das P450c17 im endoplasmatischen Reticulum, das die 17α-Hydroxylase- und die 17,20-Lyase-Aktivitäten katalysiert (CYP17). Das P450c21, welches bei Glucocorticoiden und Mineralocorticoiden die 21-Hydroxylaseaktivität katalysiert (CYP21). Alle diese Enzyme haben höchstwahrscheinlich eine tunnelartige Struktur, welche einen gerichteten Fluss der Steroide entlang der Membranen der Mitochondrien und des endoplasmatischen Reticulums bedingen, die für die Regulation der Synthese als wichtig erachtet wird. Ausserdem ist ein Nicht-P450-Enzym an der Steroidsynthese beteiligt, die 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3ßHSD), die auch Isomerase-Aktivität hat. (53)

1984 untersuchten *Dickerman et al.* direkt die Steroidkonzentrationen in Nebennierenpräparaten und konnten dabei Unterschiede in der Konzentration einzelner Steroide und damit in der Aktivität einzelner Enzyme in den drei Zonen im Entwicklungsverlauf nachweisen. Die Aktivität der einzelnen Enzyme der Steroidgenese ist dieser Arbeit zufolge vor allem von der intrazellulären Konzentration an Steroiden und nicht von einer extrazellulären Stimulation abhängig. Es konnte ein Gradient der intraadrenalen Steroidkonzentrationen durch den adrenalen Kortex hindurch und signifikante Änderungen dieser Konzentrationen im Laufe der Entwicklung festgestellt werden. Eine wesentliche Rolle scheint dabei auch die zentripetale Durchblutung des Kortex zu spielen. Das mittlere Gewicht der Nebenniere nimmt im Säuglingsalter kontinuierlich ab und nimmt ab einem Alter von einem Jahr parallel zum Körper-

wachstum zu. Die Entwicklung der Nebennierenrindendicke verläuft ebenfalls dazu parallel. Die Aktivität der adrenalen 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase ist bei Geburt niedrig, nimmt im Kleinkinalter schnell zu und fällt während der Adoleszenz und dem Erwachsenenalter wie-

Abbildung 1: Adrenale Synthesewege der Steroide. Die kursiv gesetzen Schritte finden in den Testes bzw. Ovarien statt.



der ab (47). Das Muster der 21-Hydroxylaseaktivität verläuft entgegengesetzt dazu mit einem signifikanten Anstieg während der Adrenarche. Dieser Anstieg ist auf die äussere Schicht des Kortex beschränkt. Eine ähnliche Zunahme während der Adrenarche wurde für die 17,20-Desmolaseaktivität gefunden. Da dieser Anstieg nicht mit einem merklichen Anstieg der 17-Hydroxylaseaktivität einhergeht, obwohl beide Reaktionen von demselben Cytochrom-P-450-Enzym katalysiert werden, gehen *Dickerman et al.* davon aus, dass die Steroide eher die Aktivität der vorhandenen Enzymsysteme beeinflussen, als die Synthese neuer Cytochrome über vermehrte Transkription zu induzieren.

Die Wirkung von ACTH besteht hauptsächlich in einer globalen Zunahme der Steroidgenese und nicht in der Beeinflussung einzelner Enzymsysteme. (12) Vier Hauptmechanismen der ACTH-Wirkung auf die Steroidsynthese werden unterschieden: erstens erhöht ACTH über die Stimulation der Cholesterinesterase die Verfügbarkeit an freiem Cholesterin. Zweitens erleichtert ACTH den Cholesterintransport in die Mitochondrien. Drittens fördert ACTH die Bindung von Cholesterin an das P450c11, und viertens stimuliert ACTH die Freisetzung von neu synthetisiertem Pregnenolon. Alle diese Schritte sind ganz am Anfang der Synthesewege zu finden und wirken innerhalb von Minuten. Als Langzeiteffekt ist ACTH für die Aufrechterhaltung einer normalen Konzentration an P450c11 verantwortlich. (53)

Von einigen Autoren wurde die Existenz eines separaten, androgenstimulierenden Hormons, das die Cortisolsynthese unbeeinflusst liesse, angenommen. Es wurde sogar von einer Arbeitsgruppe ein entsprechendes Peptidhormon identifiziert. (64) Allerdings konnten diese Er-

gebnisse in anderen Studien nicht bestätigt werden und ein Zusammenhang mit der Initiierung der Adrenarche ist für das beschriebene Peptid nicht wahrscheinlich (28). Allerdings haben einige Hormone einen direkten Einfluss auf die Steroidsyntheseenzyme, darunter z. B. *Insulin-like growth factor I* (IGF-I) und IGF-II, die die Aktivität der 17ß-Hydroxylase und der 3ß-HSD verstärken. (44)

Adrenarche ist der Begriff, der die reifungsbedingte Zunahme der adrenalen Androgenproduktion kennzeichnet, die bei Mädchen und Jungen zwischen dem sechsten und achten Lebensjahr stattfindet, ungefähr zwei Jahre vor dem Beginn der Gonadenreifung und der Pubertät (Gonadarche) (70, 27). Das Antwortmuster auf die hypophysäre Stimulation mit ACTH ändert sich: Es werden zunehmend die 17-Ketosteroide DHEA und DHAS gebildet (70, 27).

Die Zunahme der Serumkonzentration von DHAS spiegelt normalerweise den Prozess der Adrenarche wieder (70). Grundlage dieser Entwicklung scheint eine Aktivitätszunahme der 17,20-Lyase, und in geringerem Masse auch der 17α-Hydroxylase, zu sein (76, 12). *Miller* hat 1988 gezeigt, dass beim Menschen die adrenale 17,20-Lyase und die 17α-Hydroxylase zwei Aktivitätsformen eines einzigen Enzyms, des P450c17 sind, welches den Δ^5-Sytheseweg bevorzugt (53).

Rich et al. haben eine zeitgleiche Abnahme der 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität gefunden. (68)

Mit etwa sechs Jahren beginnt der Serum-Spiegel an DHAS von einem Nadir um 10 µg/dl aus anzusteigen, mit etwa acht Jahren übersteigen die Werte bei Jungen die der Mädchen. Mit elf Jahren beträgt der DHAS-Spiegel bei Jungen im Durchschnitt 120 µg/dl und steigt im Laufe der Pubertät auf einen Durchschnittswert von 317 µg/dl bei erwachsenen Männern an. Bei weiblichen Personen betragen die Werte ab dem elften Lebensjahr etwa die Hälfte der beschriebenen Werte. Pubesbehaarung tritt bei interindividuell sehr variablen DHAS-Werten auf, in der Regel bei über 40 µg/dl. (71, 27)

Die Urinausscheidung von 17-Ketosteroiden nimmt dramatisch zu (86, 27). Über eine etwaige vermehrte Bildung des Zona-fascilculata-Produkts Androstendion herrschen verschiedene Meinungen, es scheint aber im Rahmen der Adrenarche im Serum erst spät anzusteigen (27, 47).

Allerdings ist die Rolle von DHAS bei der Induktion der Pubesbehaarung umstritten, da auch die Applikation hoher DHAS-Dosen bei Kindern mit verspäteter Adrenarche die Ausbildung von Scham- oder Achselbehaarung nicht induzieren konnte (16).

Worauf jedoch die Initiierung der beschriebenen Veränderungen beruht, ist noch nicht gesichert. Von einigen Autoren wird angenommen, dass Leptin als Indikator für die Fettmasse

und IGF-1 für die Grösse und fettfreie Körpermasse eine Schlüsselrolle spielen. Diese Mediatoren sollen bei Erreichen einer bestimmten Körpermasse die Zunahme der adrenalen Androgensekretion mediieren. Der Leptinrezeptor konnte in der Nebennierenrinde bereits nachgewiesen werden. Aber auch der Weg der zerebralen Information über die Körpermasse mit nachfolgender Aktivierung der hypophysären, adrenalen und gonadalen Achse ist denkbar. (67, 45, 7)

1.3 Prämature Adrenarche

Die Androgen-Spiegel der Patienten mit Prämaturer Pubarche erreichen Werte, die sonst im Pubertätsstadium 2 nach *Tanner* liegen (73).

Die grosse interindividuelle Varianz der DHAS-Spiegel bei Auftreten von Pubesbehaarung, sowohl bei normalen Personen als auch bei Patienten mit Prämaturer Pubarche, kann als Anhaltspunkt die These einer vermehrten Androgenempfindlichkeit der Haarfollikel bei Patienten mit Prämaturer Pubarche unterstützen. (71, 36)

Es besteht nun aber die Frage, ob die Prämature Pubarche Folge einer normalen, aber eben verfrühten Adrenarche ist oder ob ein Enzymdefekt vorliegt, durch den Hormonwerte wie bei der physiologischen Adrenarche schon in einem früheren Lebensalter auftreten (70).Von einigen Autoren wird ein 3ßHSD-Mangel als Ursache erhöhter DHEA und 17-Hydroxypregnenolon-Spiegel nach ACTH-Stimulation angesehen (89). Bei erwachsenen Frauen mit Hirsutismus, die ein ähnliches Antwortmuster auf ACTH-Stimulation aufwiesen, ergab ein ovarieller Stimulationstest jedoch einen überhöhten Anstieg von 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP) und Androstendion. Dies spricht gegen einen Enzymdefekt und weisst eher auf eine Dysregulation der ovariellen 17α-Hydroxylase- und 17,20-Lyase hin, die wahrscheinlich dem Syndrom der Polyzystischen Ovarien (PCOS) zugrundeliegt. In Analogie hierzu könnte auch bei Kindern mit Prämaturer Pubarche von einer Dysregulation der 17α-Hydroxylase- und 17,20-Lyase in der Nebennierenrinde ausgegangen werden. (70)

Andererseits wurde von vielen Autoren immer wieder ein heterozygoter Mangel an 21-Hydroxylase als Ursache für die erhöhten 17-OHP-Spiegel diskutiert. Grundlage dieser Diskussion ist die Beobachtung, dass Patienten mit Prämaturer Pubarche häufig ein Antwortmuster besonders von 17-OHP auf ACTH-Stimulation aufweisen, die dem von obligat heterozygoten Angehörigen von Patienten mit Adrenogenitalem Syndrom (AGS) gleicht. (19, 39) Allerdings ist besonders bei Patienten mit hispanischer Ethnie sehr häufig beschrieben worden, dass das Late-onset-AGS durch die Prämature Pubarche erstmals auffällt und diese homozy-

gote Form des Enzymmangels in diesen Ländern eine häufige Ursache der Prämaturen Pubarche ist. (23, 31)

1.4 Genetik des 21-Hydroxylase-Mangels

Das Adrenogenitale Syndrom ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die zu über 95% auf Mutationen im CYP21-Gen beruht. Die zwei wesentlichen Formen sind zum einen die salzverlierende Form (englisch: *salt wasting* = SW), bei der die 21-Hydroxylaseaktivität komplett fehlt. Die Aldosteronsynthese ist somit nicht möglich. Zusätzlich wird durch den blockierten Syntheseweg eine grosse Menge an Androgenen sezerniert, was zur pränatalen Virilisierung des äusseren Genitales bei Mädchen führt. Zum anderen gibt es die einfach virilisierende Form (englisch: *simple virilizing* = SV), bei der eine ausreichende Restaktivität zur Aldosteronsynthese vorhanden ist. Mildere Formen des 21-Hydroxylase-Mangels fallen oft erst durch Prämature Pubarche oder Wachstumsbeschleunigung im Kindesalter bzw. durch Menstruationsunregelmässigkeiten, Hirsutismus oder Unfruchtbarkeit im Erwachsenenalter auf und werden als nicht-klassisches AGS (englisch: *Non-classical-congenital adrenal hyperplasia* = NC-CAH) oder Late-onset-AGS bezeichnet. Die Diagnose des AGS beruht im Wesentlichen auf der Bestimmung des 17-Hydroxyprogesterons im Serum im Rahmen des Neugeborenenscreenings. (94)

Genaue Häufigkeiten sind nur für die klassischen Formen des AGS bekannt. In München beträgt die Häufigkeit nach einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1985 1:7000. Die Heterozygotenhäufigkeit berechnet sich demnach nach der Hardy-Weinberg-Regel als 1:37 (26). Für die nicht-klassische Form ist aufgrund der oft oligosymptomatischen Klinik und der erst spät einsetzenden und milderen Hyperandrogenämie keine genaue Häufigkeit bekannt. Nach einigen Studien ist sie der wahrscheinlich häufigste autosomal-rezessiv vererbte Gendefekt. Einige Bevölkerungsgruppen sind besonders häufig betroffen: bei den Ashkenazi Juden 1:27, bei Hispaniern und Jugoslaven 1:50-1:60, bei den Italienern 1:300. Bei den anderen Kaukasiern beträgt die Häufigkeit für NC-CAH etwa 1:1000. Die Häufigkeit der Heterozygotie nach Hardy-Weinberg ist demnach für NC-CAH 1:16. (85) Wenn Heterozygotie für 21-Hydroxylase-Mangel als Ursache der Prämaturen Pubarche angenommen wird, müssten folglich signifikant mehr Heterozygote unter den Patienten mit Prämaturer Pubarche gefunden werden.

Das CYP21-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 inmitten der HLA-Region und wird eng mit den HLA-Genen gekoppelt vererbt (94). Zum Beispiel haben Personen mit Bw47 ein 50fach erhöhtes Risiko, AGS-Carrier zu sein, solche mit B14 ein 250faches Risiko,

Carrier für NC-CAH zu sein. Auch können bestimmte HLA-Typen verschiedenen Krankheitsformen zugeordnet werden, so ist HLA Bw47 mit der SW-Form, B5 mit der SV-Form und B14 mit der NC-Form assoziiert. (26)

Das CYP21-Gen umfasst 3447 bp und ist in zehn Exons und neun Introns unterteilt, die codierende DNA umfasst 2 kb und die abgeleitete Aminosäuresequenz ergibt ein Protein mit 494 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 55 000 d (52). Das Pseudogen CYP21P liegt in der gleichen Region. CYP21 und CYP21P zeigen ca. 98% Homologie in den Exons und ca. 96 % in den Introns. (25)

Als Ursache, dass CYP21P ein Pseudogen ist, liegen die folgenden Unterschiede vor: eine 8 bp Deletion in Exon 3 und eine 1 bp Insertion in Codon 306, Exon 7, was jeweils zu Verschiebung des Leserastern mit Stoppcodon führt.

Ein einzelner Basenaustausch C→T in Codon 318, Exon 8, resultiert ebenfalls in einem Stoppcodon. Diese Mutationen bewirken, dass kein funktionelles Protein synthetisiert werden kann.

In der 5`- und 3`- flankierenden Region beider Gene befinden sich zwei identische TaqI-Restriktionsstellen, die 3,7 kb voneinander entfernt sind. Durch eine zusätzliche TaqI-Restriktionsstelle in der 5`-flankierenden Region des CYP21P-Gens (211 bp *„upstream“* des ATG Initialcodons) ergeben sich in genomischen Blots Fragmente unterschiedlicher Grösse für CYP21 (3,7 kb) und CYP21P (3,2 kb).

Die meisten der AGS-bedingenden Mutationen sind durch Gentransfer zwischen dem CYP21P- und dem CYP21-Gen bei falscher Paarung in der Meiose entstanden. Dies wird oft als Genkonversion bezeichnet. Punktmutationen sind hauptsächlich innerhalb einer betroffenen Familie zu finden. Zumeist werden die Mutationen von zwei heterozygoten Elternteilen auf die Kinder übertragen. 65-75% der Patienten sind daher *compound* heterozygot (42). Nur etwa 1% der Mutationen entstehen *de novo*. (93,94) In der Arbeit von *Krone et al.* von 1998 waren Deletionen, grosse Konversionen und die von uns untersuchten Punktmutationen für 98,9% der Mutationen der untersuchten 182 Allele verantwortlich (43).

Die klinische Expression des AGS korreliert mit der weniger schwerwiegenden Mutation, d.h. mit der Restaktivität der 21-Hydroxylase. (42)

Drei Mutationen kommen besonders häufig bei der NC-Form vor: Val282Leu im Exon 7 als häufigste (85), Pro454Ser im Exon 10 (91) und Pro31Leu im Exon 1 (90, 91, 8). Diese Mutationen beeinträchtigen die sekundäre Struktur des 21-OH-Enzyms, welches *in vitro* eine Restaktivität von 20-60% aufweist (90, 8).

1.5 Historischer Überblick über die Forschung zur Prämaturen Pubarche

Obwohl bereits zuvor in einigen Lehrbüchern der Pädiatrie und pädiatrischen Endokrinologie (86, 97) die Existenz einer Prämaturen Adrenarche und Pubarche erwähnt wurde, wurde 1952 von *Silverman et. al.* die erste systematische Untersuchung an Patienten mit isoliert aufgetretener Pubesbehaarung durchgeführt (81). Es handelte sich um 27 Mädchen, bei denen die Pubarche vor dem achten Lebensjahr aufgetreten war und um einen Jungen, bei dem dies mit 8,25 Jahren der Fall war. An Befunden war eine Akzeleration des Knochenalters um ein bis vier Jahre aufgefallen. Allerdings wurde in der Verlaufsbeobachtung keine Tendenz zum vorzeitigen Epiphysenschluss mit konsekutivem Kleinwuchs festgestellt. Als wichtigste Differentialdiagnosen wurden adrenale Tumore und das Adrenogenitale Syndrom gesehen, welche durch Abwesenheit von Zeichen exzessiver Androgensekretion wie Virilisierung und Klitorisvergrösserung, Akne, Hirsutismus, erhöhte Muskelmasse und stark beschleunigtes Wachstum sowie die Messung von 17-Ketosteroiden im Urin ausgeschlossen wurde. Allerdings wurde eine gering erhöhte adrenale Androgensekretion als Ursache der Pubarche angenommen, deren Ursache aber ungeklärt blieb, ebenso wie die Tatsache, dass hauptsächlich Mädchen betroffen sind.

Seit der Erstbeschreibung der Prämaturen Pubarche wurde eine erhöhte adrenale Androgenproduktion als Ursache vermutet. *Conly et al.* verglichen 1967 die 17-Ketosteroidausscheidung im Urin sowie die Plasmakonzentrationen und Ausscheidung einzelner Androgene bei 16 präpubertären Kontrollpersonen, sieben Mädchen mit Prämaturer Pubarche und sechs Kindern mit Adrenogenitalem Syndrom. Sie fanden bei den Mädchen mit Prämaturer Pubarche eine normale Exkretion der 17-Ketosteroide im Urin, aber eine selektiv erhöhte Ausscheidung androgen wirksamer Steroide. Bei einer Patientin wurde eine Suppression der Androgenexkretion im Urin durch Dexamethason nachgewiesen, was als weiterer Hinweis für einen adrenalen Ursprung der Androgene gewertet wurde. (11)

In der Folgezeit etablierte sich die Bestimmung der 17-Ketosteroidausscheidung im Urin als Untersuchungsmethode der Wahl bei Patienten mit vorzeitiger Pubesbehaarung oder Zeichen der Virilisierung. Allerdings konnte von *August et al.* gezeigt werden, das auch eine starke Erhöhung der Plasma-Androgene nur einen minimalen Anstieg der 17-Ketosteroide im Urin zur Folge haben kann.

August et al. haben dann auch 1975 bei einer Gruppe von 18 Patienten mit Prämaturer Pubarche, davon 16 Mädchen und zwei Jungen, die Androgen-Konzentrationen im Plasma mit denen einer Kontrollgruppe von neun Mädchen und 23 Jungen verglichen. Es fanden sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede. Deswegen waren die beiden Gruppen vergleichbar. Die Untersucher fanden lediglich signifikant höhere Androstendion-Spiegel bei den Patienten mit Prämaturer Pubarche. Die 17-Hydroxyprogesteron-Spiegel unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Daraus schlossen die Autoren, dass ein 21-Hydroxylase-Mangel keine häufige Ursache für die Prämature Pubarche sein könne. Allerdings erstreckte sich diese Annahme vor allem auf das Adrenogenitale Syndrom. Eine milde Form des Enzymmangels hielten sie für möglich. (2)

Eine weitere gross angelegte Studie wurde 1976 von *Korth-Schutz et al.* durchgeführt: Bei 85 Mädchen und 101 Jungen wurde durch Messungen von Testosteron, testosteronähnlichen Substanzen, Dihydrotestosteron, DHEA und Androstendion das normale Entwicklungsmuster der Androgensekretion im Bezug zum jeweiligen Pubertätsstadium nach *Tanner* bestimmt. Die wesentlichen neuen Ergebnisse waren: Erstens gebe es nur für Testosteron und Dihydrotestosteron Geschlechtsunterschiede. Zweitens stiege DHEA als einziges Androgen schon vor Pubertätsbeginn an, was als Beweis dafür gewertet wurde, dass die Adrenarche schon vor der Gonadarche beginne. Von den Autoren wurde weiterhin eine Gruppe von 22 Mädchen mit Prämaturer Pubarche untersucht. Bei dieser fanden sich signifikant höhere Konzentrationen an Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und DHEA im Vergleich zu gleichaltrigen präpubertären Kindern. Sie waren aber vergleichbar zu denen der Gruppe mit *Tanner*-Stadium 2.
Zwölf dieser Mädchen konnten im Langzeitverlauf beobachtet werden, wobei sich zwar eine Fluktuation der Androgen-Spiegel, besonders von DHEA zeigte, aber keine Zunahme im Verlauf.
Die Schlussfolgerung, die aus dieser Beobachtung gezogen wurde, war, dass es bei der Prämaturen Pubarche zu einer verfrühten Reifung der Nebennierenrinde käme, die sich aber in ihrer Funktion im Verlauf normal entwickle. (40)

Es bestand also seit jeher die Frage, ob es sich bei der Prämaturen Pubarche um eine fuktionelle Variante oder um einen Enzymdefekt handelte, z. B. im Sinne eines heterozygoten 21-Hydroxylasedefekts.

Im Rahmen von Studien zur genetischen Beratung wurden 1977 von *Gutai et al.* Eltern von Kindern mit AGS untersucht, die also obligat heterozygot für AGS waren. Bei dem durchgeführten ACTH-Test wurde bei zehn von vierzehn Personen ein Progesteron- und 17-Hydroxyprogesteron-Anstieg gefunden, der über zwei Standardabweichungen (SD) über dem Mittelwert der 16 Kontrollpersonen lag. Das heisst nur in 71% der Fälle war bei sicherer Heterozygotie für AGS das ACTH-Testergebnis auffällig. (22)

Im gleichen Zusammenhang wurden 1979 von *Weil et. al.* 71 Eltern von AGS-Patienten sowie 60 adulte Kontrollpersonen mittels ACTH-Test untersucht. Es wurde bei einer 17-OHP-Konzentration, die zwei Standardabweichungen über dem Mittel der Kontrollgruppe lag, eine Heterozygotie für AGS angenommen. Im Rahmen dieser Studie konnte festgestellt werden, dass bei Frauen der 17-OHP-Anstieg nach ACTH-Administration nach Dexamethason-Suppression am Vorabend aufgrund der einheitlicheren basalen Sekretion des adrenalen Kortex sensitiver wurde. Dieses Verfahren konnte sich aber in der praktischen Durchführung der ACTH-Tests nicht durchsetzen. Als weitere Bedingung wurde ein Testzeitpunkt in der frühen Follikelphase des Mentruationszyklus bei Frauen angesehen (Tag 3-8), da hier die ovarielle Androgensekretion sehr niedrig ist und die Androgene im Serum deswegen hauptsächlich adrenalen Ursprungs sind. (95)
Ausserdem wurde die enge Kopplung mit dem HLA-System als diagnostische Möglichkeit erkannt. Allerdings ist diese nur nutzbar, wenn bereits mindestens ein AGS-Fall in der Familie bekannt ist.

In einer Übersichtsarbeit zeigte *Pang* 1981 als mögliche Ursachen der Prämaturen Pubarche entweder eine verfrüht beginnende Reifung der hypothalamisch-hypophysär-adrenocorticalen Achse oder eine veränderte Antwort des adrenalen Kortex auf ACTH auf. (63)

Rosenfield et. al. führten 1982 die einzige Untersuchung durch, bei der nur Jungen mit Prämaturer Pubarche einbezogen wurden. Fünf Patienten hatten erhöhte basale DHAS-Spiegel, vier hatten altersentsprechende Werte. Alle Patienten hatten entweder zerebrale Beeinträchtigungen oder waren adipös. Dies legt eine von der bei den Mädchen, bei denen eine idiopathische Prämature Pubarche viel häufiger auftritt, unterschiedliche Pathogenese nahe. Die Testosteron-Spiegel und das Knochenalter der Patienten waren altersentsprechend und das Muster der Steroidantwort auf ACTH entsprach eher dem der Adrenarche als dem bei 21-Hydroxylase-Mangel, d.h. es wurden für das Alter erhöhte DHAS-Konzentrationen gefunden sowie norma-

le 17-OHP-Spiegel. Das interessanteste Ergebnis dieser Studie war die Beobachtung, dass eine breite Variabilität der DHAS-Spiegel bei Auftreten von Pubesbehaarung sowohl bei den Patienten als auch bei den 33 Kontrollpersonen vorlag, die eine interindividuell sehr unterschiedliche Sensitivität der Haarfollikel nahelegt. (71)

New et al. haben 1983 in einer gross angelegten Studie 29 ACTH-Tests an Patienten mit klassischem AGS, 51 an Patienten mit der nicht-klassischen Form, 255 an Heterozygoten beider Formen und 104 an Normalpersonen durchgeführt. Anhand der Ergebnisse konnten Referenzwerte in Form von Nomogrammen festgelegt werden, nach denen die verschiedenen Gruppen eindeutig zu unterscheiden seien. Der Mittelwert für 17-OHP nach 60 min. betrug für die Heterozygoten 639 $\pm$ 255 ng/dl, für die Kontrollpopulation 351 $\pm$ 221 ng/dl. In den Nomogrammen wurde die Beziehung zwischen basalen und stimulierten Werten dargestellt. Dabei zeigte sich eine signifikante Überlappung zwischen der Normalbevölkerung und den obligat Heterozygoten. Die Autoren versuchten dies mit der hohen Heterozygotenfrequenz in der Normalbevölkerung zu erklären, die für das klassische AGS ca. 1:35 beträgt, für die nichtklassische Form aber noch sehr viel höher eingeschätzt wird. Die Autoren gingen also davon aus, dass es eine 17-OHP-Antwort auf ACTH gebe, die typisch für Heterozygote sei. (60)

Mit den zunehmenden Möglichkeiten der genetischen Diagnostik wurde erkannt, dass das 21-Hydroxylase-Gen eng mit der HLA-Region gekoppelt ist. So konnte das HLA-Muster von AGS-Patienten und ihren Familienangehörigen untersucht werden, wobei auffiel, dass bestimmte HLA-Muster, die in der Allgemeinbevölkerung selten sind, bei AGS-Patienten häufig sind. Hieraus kann sowohl bei asymptomatischen Familienangehörigen, als auch bei Personen der Allgemeinbevölkerung eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Heterozygotie für AGS abgeleitet werden. Dies trifft insbesondere für HLA B14 und Bw47 zu, die praktisch ausschliesslich im Zusammenhang mit AGS-Genen gefunden wurden. Ausserdem auch für das HLA-Antigen B5(w51), das in der Normalbevölkerung ausserordentlich selten ist. Eine entsprechende Untersuchung wurde 1985 von *Höller et al*. an 157 Patienten mit AGS und 333 Verwandten von AGS-Patienten aus 134 deutschen Familien durchgeführt, bei der auch die Ergebnisse der HLA-Analyse mit den Ergebnissen eines ACTH-Tests korreliert wurden. Eine Koinzidenz zwischen den Ergebnissen der HLA-Analyse und dem ACTH-Test wurde in 80% der Fälle gefunden. Dabei wurde eine signifikant höhere 17-OHP-Antwort bei Heterozygoten der SW-Form als bei denen der SV-Form gefunden. (26)

Ebenfalls 1985 erschien eine Arbeit von *Granoff et al.,* die 15 Patienten mit Prämaturer Pubarche sowie 20 gesunde Kinder mittels ACTH-Test untersuchte. Die 17-OHP-Antwort auf ACTH war bei den zehn Mädchen mit Prämaturer Pubarche signifikant unterschiedlich von der der Kontrollgruppe und im gleichen Bereich zu finden wie die von fünf obligat Heterozygoten für AGS, die ebenfalls getestet wurden. Im Unterschied dazu wies keiner der fünf Jungen mit Prämaturer Pubarche eine erhöhte 17-OHP-Antwort auf. Dadurch sahen die Autoren die schon von *Rosenfield* 1982 aufgestellte These einer unterschiedlichen Pathogenese der Prämaturen Pubarche bei Mädchen und Jungen bestätigt. Bei Mädchen wurde von einem milden adrenalen Steroidsynthesedefekt ausgegangen. Bei sieben der zehn Patientinnen wurde das Knochenalter bestimmt, welches bei allen im Bereich des chronologischen Alters lag. Als problematisch sahen die Autoren dieser Studie an, dass Mädchen mit Prämaturer Pubarche zwar eine 17-OHP-Antwort auf ACTH haben, die der von obligat Heterozygoten für AGS gleicht, dass aber die obligat heterozygoten Mütter von Kindern mit AGS keine Anamnese mit Prämaturer Pubarche haben. (19)

Bei Patientinnen mit Acne vulgaris und Hirsutismus stellte sich seit jeher die Frage, ob die Androgene adrenalen oder ovariellen Ursprungs seien. 1986 wurden von *Lucky et al.* ACTH-Tests an 31 jungen Frauen mit Zeichen erhöhter Androgen-Spiegel in Form von Akne und/oder Hirsutismus durchgeführt. Zum Vergleich wurden Tests an 14 gesunden Frauen herangezogen. 58% der Frauen hatten erhöhte Antworten zumindest eines Steroids. Neun (29%) der Patientinnen wiesen ein Antwortmuster auf, das einer milden Form des AGS oder einer Heterozygotie entsprach: Vier für 21-Hydroxylase-Mangel, zwei für 11ß-Hydroxylase-Mangel, drei für 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Mangel. Neun (29%) weitere hatten ein Muster, welches eine relativ insuffiziente 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenaseaktivität mit relativer Hyperaktivität der 17,20-Lyase ohne Beeinträchtigung der Cortisolsekretion nahelegte. Dies bezeichneten die Autoren als „exaggerierte Adrenarche“, in der Annahme einer Analogie zur funktionellen Adrenarche mit Hyperplasie der Zona reticularis, nur eben in einem späteren Lebensalter. Warum diese Patientinnen eine so stark Androgen-produzierende Nebenniere haben sollten, blieb unklar. Insgesamt hatten 45% der Patientinnen mit isolierter Akne eine abnorme Antwort auf ACTH, dagegen 71% der Patientinnen mit Akne und Hirsutismus. Die Autoren schlossen daraus, dass in ungefähr der Hälfte der Fälle (58%) von Hyperandrogenismus mit Akne und/oder Hirsutismus, eine adrenale Komponente gefunden werden kann. (49)

Kaplowitz et al. waren 1986 die ersten, die einen zusätzlichen Effekt des Hyperandrogenismus bei Prämaturer Adrenarche beschrieben: den adulten Schweissgeruch, den sie bei 23 der von ihnen untersuchten 24 vorwiegend schwarzen Mädchen mit Prämaturer Pubarche fanden, aber nur bei einer der 17 normalen Kontrollpersonen. Diese Studie zeigte einen erhöhten Mittelwert für DHAS bei den untersuchten Patientinnen. Allerdings wurde eine breite Überlappung mit den gesunden Kontrollen festgestellt. Die DHAS-Spiegel lagen in dem Bereich, der für das *Tanner*-Stadium 2 als normal gilt. (36)

Die wichtigste Arbeit, auf die unsere Studie eingeht, ist die Untersuchung von *Knorr et al.* im *Dr. von Haunerschen Kinderspital* aus dem Jahre 1986. Damals wurde eine Vielzahl von Patienten mit verschiedenen klinischen Zeichen des Hyperandrogenismus einem ACTH-Test unterzogen, davon 89 Patienten mit Hirsutismus, 75 mit Prämaturer Pubarche, 37 mit frühem Pubertätsbeginn und 22 mit Pubertas praecox. Hirsutismus wurde hier als *Tanner*-Stadium 6 bei postmenarchalen Mädchen definiert. Es wurde mit den ACTH-Tests untersucht, wieviele der genannten Patienten heterozygote Carrier für 21-Hydroxylase-Mangel sein könnten. Dazu wurden ACTH-stimulierte 17-OHP-Werte, die mehr als zwei Standardabweichungen über dem Durchschnitt der untersuchten Kontrollgruppe lagen, als pathologisch und hinweisend auf 21-Hydroxylase-Mangel gewertet. Von den untersuchten obligat heterozygoten Angehörigen von AGS-Patienten fiel der ACTH-Test bei weiblichen Heterozygoten für die SV-Form in 71% pathologisch aus, bei denen für die SW-Form in 86% der Fälle.
In der Allgemeinbevölkerung ist ein derartiges Testergebnis *per definitionem* in weniger als 2% der Fälle zu erwarten. In der Kontrollgruppe mit 168 Personen zeigten nur zwei Personen stimulierte 17-OHP-Werte, die über der so ermittelten Grenze von 260 ng/dl lagen. In der genannten Arbeit hatten 33% der hirsuten Patienten, 41% derer mit Prämaturer Pubarche und 27% derer mit früher Pubertät eine 17-OHP-Antwort auf ACTH, die derjenigen von obligat Heterozygoten glich. Dagegen zeigten nur 17% der Patienten mit Pubertas praecox ein abnormes Testergebnis. Daraus schlossen *Knorr et al.*, dass Heterozygotie für 21-Hydroxylase-Mangel eine Hauptrolle in der Pathogenese dieser Störungen spiele. Allerdings waren die basalen 17-OHP-Werte bei keinem der untersuchten Patienten erhöht, sodass die Frage, wie es unter physiologischen Bedingungen zu den genannten klinischen Symptomen komme, ungeklärt blieb. Desweiteren war unklar, warum nur 20-40% der Patienten einen pathologischen ACTH-Test hatten, während die anderen, die sich klinisch nicht unterschieden, normale Test-

ergebnisse aufwiesen. Deswegen wurde von *Knorr et al*. eine heterogene Genese dieser Syndrome angenommen. (39)

Ein Jahr später wurde von *Temeck et al.* in einer sehr ähnlichen, weniger umfangreichen Studie eine noch höhere Inzidenz an Enzymdefekten gefunden. Von 23 Patienten mit Prämaturer Pubarche, davon 19 Mädchen und vier Jungen, hatten 30% in einem ACTH-Test 17-OHP-Werte, die im Vergleich mit den Nomogrammen von *New et al.* auf eine nicht-klassische Form des 21-Hydroxylase-Mangels schliessen liessen. Bei 13% wurde anhand der 17-Hydroxypregnenolon- und DHEA-Werte sowie des 17-Hydroxypregnenolon/17-OHP-Verhältnisses ein milder 3ß-Hydroxysteroid-Dehydrogenasedefekt angenommen. Bei 57% der Patienten wurde kein Enzymdefekt gefunden, und es wurde eine idiopathische Prämature Pubarche angenommen. Von diesen Patienten hatte nur ein Mädchen eine typisch heterozygote Antwort auf ACTH-Stimulation. Das Knochenalter war bei den Patienten mit nachgewiesenem Enzymdefekt tendenziell weiter fortgeschritten. Es gab aber keinen Unterschied im Alter der Pubarche. Bei nur einem dieser Patienten kam es zum Forschreiten der Schambehaarung, bei den anderen zu einem Wachstumsspurt, weswegen 57% dieser Patienten mit Glucocorticoiden behandelt wurden.
Die Ergebnisse dieser Studie liessen erneut eine intensivere Diagnostik mit ACTH-Test und eine engmaschigere Beobachtung von Patienten mit Prämaturer Pubarche notwendig erscheinen, da die 43% Patienten mit einem Enzymdefekt sich bei Diagnosestellung klinisch nicht von den übrigen unterschieden und erst im Verlauf auffällig wurden. Allerdings lag die hohe Inzidenz homozygoter Enzymdefekte wohl hauptsächlich an der ethnischen Zugehörigkeit der Patienten mit den entdeckten Enzymdefekten, da 43% Ashkenazi Juden, 43% Hispanier und 14% Italiener waren, also aus den ethnischen Gruppen mit der höchsten Frequenz an nicht-klassischem 21-Hydroxylase-Mangel stammten. Ausserdem nahmen die Autoren aufgrund der Tatsache, dass sie unter den Patienten mit Prämaturer Pubarche nur einen heterozygoten Carrier gefunden hatten, an, dass dieser Umstand pathogenetisch nicht relevant sei. Eine grosse Bedeutung wurde dem bei einigen Patienten gefundenen 3ß-HSD-Mangel zugemessen. Dies konnte durch weitere Studien allerdings nicht bestätigt werden. (89)

Weiterhin wurde aber der 21-Hydroxylase-Mangel als Ursache für klinischen Hyperandrogenismus erforscht. Vor allem der Late-onset-Form des AGS wurde eine zunehmende Bedeutung zugemessen. Zum Beispiel untersuchten *Azziz et al.* 164 Frauen mit Hirsutismus und/oder hyperandrogener Oligomenorrhoe sowie 21 gesunde Kontrollpersonen mit ACTH-

Tests. 7,9% der Patientinnen wiesen ein abnormes Ergebnis des ACTH-Tests auf, 2,4% hatten 17-OHP-Werte, die 3-20fach über der 95ten Perzentile lagen und somit als NC-AGS diagnostiziert wurden. 5,5% hatten 17-OHP-Werte, die weniger als dreifach über der 95ten Perzentile lagen und als leichte Form des 21-Hydroxylase-Mangels eingestuft wurden. Da zum Beispiel Patientinnen mit PCOS klinisch von denjenigen mit adrenalem Hyperandrogenismus nicht zu unterscheiden seien, schlugen die Autoren dieser Studie ein abgestuftes Vorgehen bei klinischen Zeichen des Hyperandrogenismus vor: zuerst eine Bestimmung des basalen 17-OHP-Spiegels; sollte dieser unter 200 ng/dl liegen, sei ein Enzymdefekt praktisch ausgeschlossen. Läge er darüber, wäre ein ACTH-Test zur Diagnosestellung notwendig. (4)

Im gleichen Jahr untersuchten *Morris et al.* eine Gruppe von 31 Patienten mit Prämaturer Pubarche, davon 28 Mädchen und drei Jungen, mit einem ACTH-Test. Zusätzlich wurden 18 präpubertäre und zwölf pubertäre Kontrollpersonen getestet. Nach den Nomogrammen von *New et al.*, die als Referenz herangezogen wurden, hatte keiner der Patienten ein NC-AGS. Allerdings waren einige Patienten mit Prämaturer Pubarche aus der Studie ausgeschlossen worden, da sie das Einschlusskriterium nicht erfüllten, das eine isolierte Pubarche ohne andere Zeichen erhöhter Androgen-Spiegel forderte. Zum Beispiel wurde eine Patientin aufgrund zystischer Akne ausgeschlossen, die im ACTH-Test eindeutig ein NC-AGS hatte. Acht Mädchen mit Prämaturer Pubarche hatten stimulierte 17-OHP-Werte, die mehr als zwei Standardabweichungen über den Mittelwerten der Kontrollgruppen lagen. Die Möglichkeit einer Heterozyotie für AGS bei diesen Patientinnen wurde von den Autoren zwar erwähnt, aber keine klinische Konsequenz ausser einer weiteren Beobachtung zur Früherkennung von möglichem postpubertären Hyperandrogenismus gezogen. 11ß-Hydroxysteroiddehydrogenase-Mangel und 3ß-Hydroxysteroiddehydrogenase-Mangel konnten bei den untersuchten Patienten ausgeschlossen werden. Die Patienten mit Prämaturer Pubarche hatten nach ACTH-Stimulation DHEA- und 17-Hydroxypregnenolon-Werte sowie eine 17-OHP/17-Hydroxypregnenolon-Ratio, die der der pubertären Kinder entsprachen. Lediglich die Androstendion-Spiegel waren mit denen der präpubertären Kinder vergleichbar. *Morris et al.* empfahlen aufgrund ihrer Ergebnisse, nur bei Vorliegen einer atypischen Prämaturen Pubarche einen ACTH-Test durchzuführen, d.h. bei Virilisierung, Wachstumsbeschleunigung oder bei einem um mehr als zwei Standardabweichungen fortgeschrittenen Knochenalter. (54)

1990 wurde von *Oberfield et al.* eine Studie mit ACTH-Tests an 34 hispanischen und schwarzen Patienten mit Prämaturer Pubarche durchgeführt, bei der keiner Hinweise auf einen 21-

Hydroxylase- oder 11ß-Hydroxylase-Mangel hatte. Dagegen bestand bei vier Patienten (12%) auf der Basis einer 17OHP/17-Hydroxypregnenolon-Ratio über zwei Standardabweichungen der *Tanner*-2-Kontrollgruppe der Verdacht eines 3ß-HSD-Mangels. Diese Patienten unterschieden sich klinisch nicht von den anderen. Allerdings konnte dieser Verdacht bei wiederholten Tests nur bei zwei Patienten bestätigt werden. Welche Bedeutung diese Ergebnisse hatten, ob erstens der 3ß-HSD-Mangel als mögliche Ursache bei allen Patienten mit Prämaturer Pubarche ausgeschlossen werden sollte und zweitens, welche Rolle die ethnische Zugehörigkeit hätte, blieb unklar. (61)

Auch bei anderen klinischen Ausprägungen von Hyperandrogenismus, zum Beispiel bei Hirsutismus, blieb die Frage der ovariellen oder adrenalen Herkunft der Androgene bestehen. In einer 1990 veröffentlichten Arbeit von *Siegel et al.* über ACTH-Tests bei 31 hirsuten Frauen wurde ein erstaunlich hoher Anteil von 61% der Patientinnen mit Hinweisen auf milde Defekte der Steroidsynthese beschrieben. 13 Patientinnen (42%) zeigten Hinweise auf einen 3ß-HSD-Mangel, fünf Patientinnen (16%) auf einen 21-Hydroxylase-Mangel und eine Patientin (3%) auf einen 11ß-Hydroxylase-Mangel. Nur zwölf Patientinnen (39%) hatten Ergebnisse im ACTH-Test, die alle innerhalb von zwei Standardabweichungen der gesunden Kontrollpersonen lagen. Die Autoren unterstrichen daher die Notwendigkeit des ACTH-Tests auch bei diesen Patientinnen, da adrenale Enzymdefekte auch bei Hirsutismus anscheinend häufiger seien als bisher angenommen wurde. Die Autoren trafen aber leider keine Aussagen, welche therapeutische Konsequenz sich aus dem Nachweis solch milder Enzymdefekte ergeben könnte. (79)

1991 wurden von *Lashanski et al.* erstmals alters-, geschlechts- und entwicklungsabhängige Normwerte für adrenale Steroide nach ACTH-Stimulation veröffentlicht, die durch ACTH-Tests an 102 gesunden Kindern ermittelt worden waren. Die wichtigsten Gruppen aber, die präpubertären und frühpubertären Kinder, unterschieden sich in den Hormonwerten nicht von denjenigen, die in früheren Studien zu Patienten mit Prämaturer Pubarche bei gesunden Kontrollpersonen ermittelt worden waren.
Als wichtige neue Erkenntnis dieser Studie kann aber die Tatsache gewertet werden, dass die Autoren bei Mädchen im Vergleich zu Jungen erhöhte 17-OH-Pregnenolon/17-OHP- und DHEA/Androstendion-Verhältnisse in der Kindheit und in der späten Pubertät fanden, die für eine erniedrigte 3ß-HSD-Aktivität bei den Mädchen spricht. Da geschlechtsspezifische Unterschiede dieser Hormonwerte bis dahin unbekannt waren, erwogen die Autoren die Möglich-

keit, dass ein milder 3ß-HSD-Mangel bei Mädchen mit Prämaturer Pubarche eventuell zu häufig diagnostiziert worden sein könnte. (47)

Ein Zusammenhang der Ätiologie der Prämaturen Pubarche mit Übergewicht wurde von einigen Endokrinologen vermutet, konnte aber nicht bestätigt werden. *Jabbar et al.* untersuchten 1991 22 Patienten mit Prämaturer Pubarche, von denen zehn übergewichtig waren. Während bei allen normalgewichtigen Patienten ein normales Knochenalter vorlag, war das Knochenalter bei sechs der übergewichtigen Patienten akzeleriert. Ausserdem wurde im ACTH-Test bei einem der übergewichtigen Patienten ein heterozygoter 21-Hydroxylase-Mangel und bei einem ein 3ß-HSD-Mangel gefunden, diese beiden Patienten unterschieden sich aber in Bezug auf die Knochenalterakzeleration nicht von den übrigen übergewichtigen Patienten. Die geringe Patientenzahl und die mangelnde Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien lässt aber der vermuteten Bedeutung des Übergewichts keine Relevanz zukommen. (35)

Die Inzidenz von 21-Hydroxylase-Mangel in hetero- und homozygoter Ausprägung unter Patienten mit Prämaturer Pubarche schwankte in den verschiedenen Untersuchungen weiterhin stark. Zum Beispiel fanden *Hawkins et al.* 1992 unter 46 Mädchen mit Prämaturer Pubarche 15% mit im ACTH-Test diagnostiziertem NC-AGS. Diese Mädchen unterschieden sich klinisch in keinster Weise von den übrigen Patientinnen. Ausserdem wiesen 54% der Patientinnen ACTH-Antworten auf, die typisch für Heterozygotie für AGS waren. Von den Autoren wurden zusätzlich ältere Patientinnen mit Hirsutismus und Oligomennorrhoe untersucht, von denen 16% ein NC-AGS und 64% stimulierten Hormonwerte im Referenzbereich für Heterozygotie aufwiesen. Es erschien daher möglich, dass eine Prämature Pubarche im Kindesalter das Risiko für Hyperandrogenismus im frühen Erwachsenenalter mit Hirsutismus und Oligomennorrhoe erhöhe, allerdings konnten keine prädiktiven Parameter evaluiert werden, sodass ein *Follow-up* von Patientinnen mit Prämaturer Pubarche, insbesondere derer mit abnormem ACTH-Test, zur frühzeitigen Erkennung von weiterbestehendem Hyperandrogenismus nötig wäre. (23)

Siegel et al. veröffentlichten 1992 eine Studie über ACTH-Tests an 69 Patienten mit Prämaturer Pubarche. 16% der Patienten hatten eine atypische Prämature Pubarche mit Vergrösserung von Klitoris bzw. Penis. Von diesen wiesen 46% Defekte der Steroidsynthese auf. Dagegen fanden sich bei den Patienten mit typischer Prämaturer Pubarche nur bei 12% der Patienten hormonelle Auffälligkeiten. Von den zehn Patienten (14%) mit verminderter 21-

Hydroxylaseaktivität hatten acht normale basale Hormonwerte, ebenso wie zwei Patienten mit 3ßHSD-Mangel. Ein ACTH-Test war hier diagnostisch wegweisend. Den Autoren war die Diagnostik dieser mitunter auch nur leichten Steroidsynthesedefekte besonders wichtig aufgrund der Vermutung des damit verbundenen Risikos eines Kleinwuchses und Hirsutismus, sowie später auftretenden Problemen wie Mensesunregelmässigkeiten, Infertilität und PCOS. (78)

Ibanez et al. führten 1992 die erste prospektive Studie über den natürlichen Verlauf, insbesondere der Pubertätsentwicklung, und die erreichte Endgrösse bei 127 Patientinnen mit Prämaturer Pubarche durch. Durch ACTH-Test war bei allen ein 21-Hydroxylase-Mangel ausgeschlossen worden. Daher wurden in dieser Studie nur Patientinnen mit sogenannter idiopathischer Prämaturer Pubarche erfasst. Akzeleriertes Knochenalter und ein Grosswuchs wurden regelhaft bei Diagnosestellung gefunden. Im Verlauf normalisierten sich diese Befunde aber wieder, die Patientinnen erreichten im Durchschnitt eine Endgrösse im Rahmen der Prognose bei Diagnosestellung, die im Mittel über der mittleren Elterngrösse lag. Auch die Menarche trat bei den untersuchten Patientinnen nicht eher als beim Bevölkerungsdurchschnitt ein. Allerdings stellten die Autoren eine erhöhte Inzidenz von Hirsutismus und Syndrom der polyzystischen Ovarien im Erwachsenenalter fest. Eine Verlaufsbeobachtung wird von den Autoren deshalb bei allen Patienten mit Prämaturer Pubarche empfohlen. (33)

Ebenfalls von *Ibanez*, die in den Folgejahren zur führenden Autorin auf dem Gebiet der Prämaturen Pubarche avancierte, wurde 1993 untersucht, wie hoch die Inzidenz an funtionellem ovariellen Hyperandrogenismus (FOH) bei postpubertären Mädchen nach Prämaturer Pubarche sei. Dazu wurden Stimulationstests mit dem GnRH-Agonisten Leuprolidacetat durchgeführt. Ausserdem wurde untersucht, ob irgendein biochemischer Parameter zum Zeitpunkt der Diagnose der Prämaturen Pubarche existierte, der zur Prädiktion des späteren FOH herangezogen werden könnte. Von den 35 untersuchten Patientinnen zeigten 16 (46%) Hirsutismus, Oligomenorrhoe und erhöhtes basales Testosteron und/oder Androstendion. Die Gonadotropin-Antwort auf den GnRH-Agonisten unterschied sich bei diesen Patientinnen nicht von den übrigen. Lediglich der 17-OHP-Spiegel nach Stimulation mit Leuprolidacetat war bei ihnen signifikant höher als bei den anderen. Es war auch keine Überlappung zwischen den verschiedenen Gruppen festzustellen.

Obwohl erhöhte poststimulatorische 17-OHP-Werte häufiger bei Patientinnen mit erhöhtem DHAS und Androstendion zum Zeitpunkt der Diagnose auftraten, konnte kein klarer prädiktiver Parameter für die Entwicklung von FOH identifiziert werden. (32)

Über die Frage, ob alle Patienten mit Prämaturer Pubarche, insbesondere die zumeist betroffenen Mädchen, einem ACTH-Test unterzogen werden sollten, bestand international weiterhin Uneinigkeit. Auch die Inzidenz an adrenalen Enzymdefekten, besonders in homozygoter Ausprägung, differierte sehr stark in den verschiedenen Veröffentlichungen. *Balducci et al.* führten 1994 eine weitere Studie an 171 Patienten mit Prämaturer Pubarche durch, bei denen sie ACTH-Tests durchführten und die sie nach den Nomogrammen von *New et al.* genotypisierten.
5,8% hatten demnach einen homozygoten 21-Hydroxylase-Mangel, d.h. ein nicht-klassisches AGS, 6,2% einen 3ß-HSD-Mangel und 11% hatten eine 17-OHP-Antwort im Bereich der Heterozygotie für 21-Hydroxylase-Mangel. Diese im Vergleich zu *Granoff et al.* (19), *Knorr et al.* (39) und *Hawkins et al.* (23) niedrige Inzidenz wurde von den Autoren auf die Einbeziehung basaler Hormonwerte zurückgeführt. *Balducci et al.* nahmen eine zu häufige Diagnose einer Heterozygotie bei den anderen genannten Autoren an.
Eine weitere Fragestellung der Studie bestand darin, ob sich die Patienten bezüglich der Knochenalterakzeleration unterschiedlich verhielten. Von den Patienten mit nicht-klassischem AGS hatten 80% ein Knochenalter über zwei Standardabweichungen für das chronologische Alter, von den Patienten mit 3ß-HSD-Mangel 71,4%, von den Heterozygoten 58% und von den übrigen Patienten 32,6%. Daraus schlossen die Autoren, dass eine Knochenalterakzeleration nicht zur Unterscheidung von Patienten mit Enzymdefekten von den Patienten mit funktioneller Ursache der Prämaturen Pubarche beitrage. Die Patienten mit nicht-klassischem AGS waren ausserdem die einzigen, die schon auffällige basale Hormonwerte aufwiesen. *Balducci et al.* hielten bei typischer Prämaturer Pubarche aufgrund der therapeutischen Relevanz die Durchführung eines ACTH-Tests nur bei bei Patienten mit auffälligen basalen Hormon-Spiegeln oder stark beschleunigtem Knochenalter für notwendig, da diese eventuell eine Steroidtherapie benötigen könnten. (5)

Eine weitere Studie mit sehr ähnlicher Fragestellung wurde 1995 von *Ibanez et al.* veröffentlicht. Von 55 mit ACTH-Test untersuchten Patienten wiesen vier (7%) ein nicht-klassisches AGS auf, von diesen hatten drei schon basal erhöhte 17-OHP-Werte, einer hatte ein normales basales 17-OHP. Ausserdem wurde bei elf (20%) der Patienten aufgrund der entweder basal

oder poststimulatorisch über zwei Standardabweichungen erhöhten 17-OHP-Werte eine Heterozygotie für AGS vermutet. Die Autoren hielten aber einen ACTH-Test in der Diagnostik einer Heterozygotie bei Kindern mit typischer Prämaturer Pubarche für nicht verlässlich und eine molekulargenetische Diagnostik für notwendig. (31)

Bei Frauen mit funktionellem ovariellen Hyperandrogenismus wurde eine Assoziation zwischen Hyperandrogenismus und Insulinresistenz bereits 1987 beschrieben (13). *Ibanez et al.* waren 1996 die ersten, die bei postpubertären Mädchen nach Prämaturer Pubarche die Stoffwechsellage mit Hilfe eines üblichen oralen Glucosetoleranztests untersuchten. Zuvor waren die Patientinnen in zwei Gruppen eingeteilt worden: Gruppe 1 mit erhöhter 17-OHP-Antwort auf Stimulation mit dem GnRH-Agonisten Leuprolidacetat, Hirsutismus und Oligomennorhoe durch einen FOH. Gruppe 2 mit normalem GnRH-Test und unauffälliger Klinik. Alle Patientinnen hatten einen normalen BMI. Von den Patientinnen der Gruppe 1 mit FOH wiesen 37%, von denen der Gruppe 2 27% einen mittleren Seruminsulin-Spiegel (MSI) auf, der deutlich über der oberen Normgrenze von 83,3 mU/l lag. Der MSI korrelierte sowohl mit dem 17-OHP-Wert im ovariellen Stimulationstest als auch mit den freien Androgen-Spiegeln. Somit sahen die Autoren einen weiteren Grund für eine konsequente Nachuntersuchung von Patientinnen mit Prämaturer Pubarche nicht allein in der möglichen Entwicklung eines FOH, sondern auch in einer damit einhergehenden Insulinresistenz. Auch wenn eine direkte Reduktion der Insulinwirkung durch Androgene hypothetisiert wurde, ist der Zusammenhang dieser Erscheinungen weiterhin ungeklärt. (30)

Über den 3ß-HSD-Mangel als mögliche Ursache der Prämaturen Pubarche herrschten ebenfalls sehr unterschiedliche Meinungen. Da die hormonellen Kriterien nicht klar definiert sind, wurden auch in den unterschiedlichen Studien sehr differierende Inzidenzen gefunden. *Sakkal-Alkaddour et al*. veröffentlichten 1996 die erste Untersuchung an 15 Patienten mit Prämaturer Pubarche, bei der sowohl ACTH-Tests als auch eine Mutationsanalyse der 3ß-HSD-Gene durchgeführt worden waren. Dabei konnte bei keinem der Kinder eine Mutation eines 3ß-HSD-Gens gefunden werden, obwohl die Serumwerte für 17-Hydroxypregnenolon und DHEA sowie das Verhältnis 17-Hydroxypregnenolon/Cortisol bei allen Patienten um 2,2-17 SD höher als bei den Kontrollpatienten lag und einige Autoren somit bereits die Diagnose eines 3ß-HSD-Mangels gestellt hätten. Von Patienten mit AGS aufgrund eines 3ß-HSD-Defekts ist bekannt, dass die genannten Hormonwerte zwischen 36 und 46 SD über dem Mittel der Normalbevölkerung im entsprechenden *Tanner*-Stadium liegen. Weiterhin konnte fest-

gestellt werden, dass obligat heterozygote Carrier für 3ß-HSD-Mutationen kein derartig abnormes Testergebnis aufwiesen. Damit konnte eine Heterozygotie als Ursache der leicht erhöhten Hormonwerte ausgeschlossen werden. Die Autoren spekulierten daher, dass die Ursache in einer gestörten Regulation der 3ß-HSD-Aktivität liegen müsse. Beweise hierfür wurden allerdings nicht erbracht. (75)

Von *Knochenhauer et al.* wurde 1997 eine Gruppe weiblicher obligat heterozygoter Carrier für AGS mit einer Kontrollgruppe bezüglich basaler und ACTH-stimulierter Androgen-Spiegel verglichen. Die prämenopausalen Heterozygoten wiesen höhere absolute und freie Testosteron-Spiegel auf, sowie erniedrigte Konzentrationen an geschlechtshormonbindendem Globulin. Kein Unterschied bestand in den basalen Spiegeln an DHEAS, Androstendion und 17-OHP. Die Heterozygoten hatten erwartungsgemäss ein höheres poststimulatorisches 17-OHP und eine höhere Differenz zwischen prä- und poststimulatorischem 17-OHP. Dagegen konnte für die Androstendion-Antwort auf ACTH kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden werden. Alle Heterozygoten wurden im Hinblick auf frühere und aktuelle Zeichen eines Hyperandrogenismus wie Hirsutismus, Oligomenorrhoe mit Zyklen über 35 Tagen, sowie Testosteron-, Androstendion- und DHAS-Spiegel über der 95. Perzentile der Kontrollgruppe evaluiert. Wenn zwei der drei genannten Kriterien vorlagen, wurde eine funktioneller Androgenexzess (FAE) diagnostiziert. Dies war bei 10,5% der Carrier der Fall. Bei einer angenommenen Inzidenz von 5-20% für FAE in der allgemeinen Bevölkerung waren die heterozygoten Carrier für AGS nicht überdurchschnittlich häufig betroffen. Deswegen konstatierten die Autoren, dass trotz der nachgewiesenen erhöhten Testosteron-Spiegel bei den Heterozygoten kein erhöhtes Risiko für klinisch apparenten Hyperandrogenismus bestünde. (38)

Blanché et al. untersuchten 1997 bei einer Patientenpopulation mit Hyperandrogenismus das CYP21-Gen, bei der im ACTH-Test erhöhte 17-OHP- und 21-Desoxycortisolwerte gemessen worden waren. 68% der untersuchten Allele wiesen die NC-Mutation Val282Leu auf, 7% die ebenfalls NC-Mutation Pro454Ser. Mutationen, die mit klassischen AGS-Formen assoziiert sind, wurden in 21% der Allele gefunden. Bei 65% der Patienten wurden NC-Mutationen nachgewiesen, bei 22% Mutationen der klassischen Formen, von letzteren war knapp die Hälfte *compound heterozygot* mit einer NC-Mutation im anderen Allel. Die Autoren empfahlen daher eine genetische Beratung dieser Individuen, insbesondere vor einer geplanten Schwangerschaft. (8)

Ab 1997 wurde die Rolle des neu entdeckten Fettgewebshormons Leptin für die Pubertätsentwicklung untersucht. *Garcia-Mayor et al.* stellten 1997 fest, dass sowohl bei Mädchen als auch bei Jungen das Leptin vor den Geschlechtshormonen anstiege. Die Leptin-Spiegel seien bei Jungen immer niedriger als bei Mädchen, nähmen aber bei Jungen bis zu einem Alter von ungefähr zehn Jahren zu um dann mit dem Anstieg des Testosterons abzufallen. Das wurde dadurch erklärt, dass bei Mädchen nicht nur eine bestimmte Körperfettmasse zur Initiierung der Pubertät notwendig sei, sondern auch die Aufrechterhaltung der Gonadenfunktion nur bei ausreichendem Fettvorrat möglich sei. Bei Jungen hingegen sei eine bestimmte Körpermasse nur zum Anstoss der Pubertätsvorgänge notwendig. Danach sei die Entwicklung unabhängig vom BMI. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, dass Leptin einen permissiven Effekt in der Pubertätsinitiierung habe. (17)

Desgleichen konnte von *Gill et al.* 1999 gezeigt werden, dass bei Jungen mit konstitutioneller Entwicklungsverzögerung ein im Altersvergleich erniedrigter Leptin-Spiegel für den BMI vorliegt. Aus den Ergebnissen dieser Studie war ersichtlich, dass die fehlende Erhöhung des Leptin-Spiegels vor der Pubertät bei Jungen mit verzögerter Pubertätsentwicklung assoziiert ist. (18)

Ibanez et al. waren 1998 die ersten, die Langzeitfolgen nach Prämaturer Pubarche jenseits von klinischen Zeichen des Hyperandrogenismus wie Hirsutismus oder Menstruationsunregelmässigkeiten hypothesisierten. Sie untersuchten in einer grossen Studie an 81 Mädchen mit ehemaliger Prämaturer Pubarche, ob diese ein kardiovaskuläres Risikoprofil mit Hyperinsulinämie und Dyslipidämie aufwiesen. Die untersuchten Patientinnen wiesen in allen Alterstufen im Vergleich zu den gleichaltrigen Kontrollpersonen erhöhte Serum-Spiegel an Insulin, Triglyceriden und VLDL auf, sowie erniedrigte Konzentrationen an geschlechtshormonbindendem Globulin. Die Autoren sahen in diesen Beobachtungen einen Hinweis, dass die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen schon im Kindesalter begännen. Der angenommene pathophysiologische Mechanismus wäre eine Stimulation der Proliferation von glatten Gefässmuskelzellen durch Insulin und vermehrte Kollagensynthese in der Gefässwand mit nachfolgender Ablagerung von Lipidplaques. Ein weiterer Grund eines engmaschigen *Follow-Ups* bei Patienten mit Prämaturer Pubarche war durch diese Beobachtungen gegeben. (28)

Bei Frauen mit PCOS wurde *von Legro et al.* 1998 ein Parameter gesucht, der ohne einen Glucosetoleranztest eine Aussage über das Ausmass der Insulinresistenz ermöglichen würde. Die beste Korrelation ergab sich für die nüchterne Glucose/Insulin-Ratio. Diese eignet sich folglich als Screening-Untersuchung zur Aufdeckung einer möglichen Insulinresistenz und zur annäherenden Einschätzung der Schwere derselben, um über die Notwendigkeit einer therapeutische Intervention zu entscheiden. (48)

2002 wurde eine Studie von *Teixeira et al.* veröffentlicht, die das Verhältnis der Morphologie der Ovarien mit Insulin, IGF-I und dessen Bindungsproteinen (IGFBP) und Serumandrogenen bei Prämaturer Pubarche untersucht. Bei Patientinnen mit microzystischen Ovarien waren die Serum-Spiegel von Androstendion und DHAS höher als bei den Patientinnen mit normaler Morphologie der Ovarien. Die Testosteron-Spiegel unterschieden sich dagegen nicht. Die nüchternen Insulin-Spiegel korrelierten negativ mit den DHAS-Spiegeln. IGF-I korrelierte dagegen positiv mit den DHAS- und Androstendion-Spiegeln. Bei 44% der Patientinnen konnte eine Insulinresistenz festgestellt werden. Dies war aber unabhängig von der Struktur der Ovarien. Die Autoren konnten folglich eine Interaktion zwischen dem Insulin-IGF-I-IGFBP- System und den adrenalen Androgenen nachweisen. Welches Ausmass diese Interaktion habe und welche Einflüsse die Androgene auf den Insulinstoffwechsel und die ovarielle Entwicklung nehmen, bleibt vorerst Gegenstand der Forschung. (88)

Ebenfalls 2002 erschien eine sehr interessante Studie von *L`Allemand et al.*. Da bei Kindern mit Adipositas die adrenalen Androgene im Serum erhöht sind, wurde von den Autoren untersucht, ob etwa Leptin, dass von den Fettzellen produziert wird, einen Einfluss auf die adrenale Hormonproduktion habe. Denn umgekehrt war beobachtet worden, dass Leptin-Mangel neben Hyperphagie und erniedrigtem Sympathikotonus auch Hypogonadismus verursachen kann. Der Zusammenhang zwischen dem Erreichen einer bestimmten Körpermasse und dem Einsetzen der Adrenarche könnte auch über eine Mediation durch Leptin mit beeinflusst werden, zumal in der Nebennierenrinde der Leptinrezeptor vorhanden ist. Ausserdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Leptin einen dosisabhängigen Einfluss auf die 17, 20-Lyaseaktivität des Cytochrom P450c17 hat (7). *L`Allemand et al.* fanden eine signifikante Korrelation zwischen Leptin bzw. BMI und DHAS-Spiegeln. In ihrer Gruppe von Patienten mit Prämaturer Pubarche, die ebenfalls untersucht wurde, war der BMI im Durchschnitt eineinhalbfach erhöht. Bei diesen Patienten war das Leptin für den BMI nicht erhöht und kann daher nicht als Ursache

der Prämaturen Pubarche aufgrund einer frühzeitig erhöhten adrenalen Androgenproduktion angeschuldigt werden. Auch korrelierten in dieser Gruppe die Androgene nicht mit dem BMI. Als weitere Beobachtung beschrieben die Autoren, dass DHAS hauptsächlich mit Leptin und dem BMI zusammenhängt, Androstendion dagegen hauptsächlich mit IGF-I und dem BMI. Es kann angenommen werden, dass Leptin mit der Körperfettmasse korreliert, IGF-I mit der Grösse und der fettfreien Körpermasse.
Insgesamt legt diese Studie nahe, dass in der normalen Entwicklung Leptin und IGF-I einen stimulierenden Einfluss auf die Initiierung der Adrenarche haben, dass aber die Pathogenese der Prämaturen Pubarche von diesen zwei Hormonen unabhängig ist (45).

1.6 Aktueller Stand der Forschung

2000 fand in Toronto, Canada, ein Symposium zur Entwicklung von Androgenexzess statt. Mit 4-7% betroffener Frauen im gebärfähigen Alter stellt Hyperandrogenismus, insbesondere das PCOS, eines der häufigsten endokrinologischen Probleme dar. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von metabolischen Komplikationen wie Typ-II-Diabetes, arterielle Hypertonie, Dyslipidämie und möglicher kardiovaskulärer Erkrankungen erfordert eine genaue Ursachenforschung zur Evaluation möglicher behandelbarer Ursachen. 21-Hydroxylase-Mangel ist bei 1-8% der betroffenen Frauen für den Hyperandrogenismus verantwortlich. Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines Hyperandrogenismus im Erwachsenenalter gelten fetale Wachstumsretardierung und Prämature Pubarche. Auch der BMI und seine Zunahme nimmt auf die adrenale Androgensekretion Einfluss. (3) Bereits im Kindesalter haben Mädchen mit Prämaturer Pubarche eine erhöhte Inzidenz von im pelvinen Ultraschall nachweisbaren polycystischen Ovarien. (9) Ausserdem gibt es Hinweise, dass die übermässige adrenocorticale Hormonantwort bei Patienten mit Prämaturer Pubarche bei denjenigen mit polycystischen Ovarien besonders ausgeprägt ist. (88)

In einer 2001 vorgestellten Arbeit mit 52 Mädchen mit Prämaturer Pubarche war das Geburtsgewicht dieser Patientinnen signifikant niedriger als das der Kontrollpersonen. Ausserdem unterschritt das Geburtsgewicht derjenigen Patienten, bei denen eine reduzierte Insulinsensitivität festgestellt werden konnte, das Gewicht derer mit normaler Insulinsensitvität. (72)

In einigen Studien wurde eine erhöhte Inzidenz der Prämaturen Pubarche unter Kindern mit zerebralen Schädigungen mit einem Geschlechtsverhältnis von 1:1 gefunden (73, 27). Patien-

ten mit Prämaturer Pubarche haben aber nicht überdurchschnittlich oft Entwicklungs- oder Verhaltensauffälligkeiten. (72)

Auch Gewichtszunahme und Übergewicht scheinen unter Umständen prädisponierende Faktoren zu sein, allerdings ist der Grossteil der Patienten normalgewichtig (27).

Unter ansonsten gesunden Patienten sind von der Prämaturen Pubarche, ebenso wie von der Pubertas praecox, Mädchen sehr viel häufiger als Jungen betroffen, mit einem Geschlechtsverhältnis von fast 10:1, wofür es bislang noch keine Erklärung gibt. (72)

Die Inzidenz an Enzymdefekten variiert zwischen den verschiedenen Studien sehr breit, zwischen 0 und 40%, was unter anderem an der oft nur auf hormonellen Daten basierenden Diagnose liegt. Desweiteren unterscheiden sich die Patientenkollektive durch unterschiedliche Einschlusskriterien in den einzelnen Studien und durch die unterschiedlichen Inzidenzen in den verschiedenen ethnischen Gruppen, vor allem für das nicht-klassische AGS, stark. Eine genaue Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines vorliegenden Enzymdefekts kann anhand von Hormonstimulationstests zum momentanen Zeitpunkt nicht getroffen werden. (27) Da in der Studie von *Ibanez et al.* einer von vier Patienten mit einem nicht-klassischen AGS normale basale 17-OHP-Werte aufwies, ist ein ACTH-Test sicherlich zum Ausschluss eines homozygoten 21-Hydroxylase-Mangels sinnvoll. (31) Ob allerdings die sichere Diagnose einer Heterozygotie mit einem ACTH-Test möglich ist, ist weiterhin zweifelhaft. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der Verlässlichkeit des ACTH-Tests durch Korrelation der Testergebnisse mit der molekularbiologischen Mutationsanalyse.

Circa die Hälfte der Mädchen, die eine Prämature Pubarche erleben, haben postpubertär eine mehr oder minder schwere Ausprägung des funktionellen ovariellen Hyperandrogenismus, davon einige im Rahmen des PCOS. Die Folgen sind Hirsutismus, Oligomenorrhoe und erhöhte Testosteron- und/oder Androstendion-Spiegel. (32, 30, 27) Diese Gefahr scheint aber besonders bei Mädchen vorzuliegen, die keinen Enzymdefekt aufweisen und bei denen folglich von einer Dysregulation des P450c17-Enzyms auszugehen ist, da dieses Enzym in Nebennieren und Ovarien gleichen Ursprungs ist. (27)
Besonders wichtig erscheint daher die zukünftige Erforschung der Regulation der Aktivität dieses Enzyms (3).

Um das Risiko der Entwicklung eines PCOS abzuschätzen, ist besonders die Familienanamnese hilfreich. 35-40% der Mütter und Schwestern von Patienten mit PCOS haben ebenfalls ein PCOS. Die Vererbung ist möglicherweise multifaktoriell, ähnlich wie bei Diabetes mellitus Typ II. (3)

Hyperinsulinämie ist ein mitverursachender Faktor des PCOS. Ausserdem erhöht Insulin die biologische Verfügbarkeit von IGF-I, welcher ebenfalls zur Stimulation der ovariellen Steroidsynthese beiträgt. Bei Mädchen mit Prämaturer Pubarche ist auch während der späteren Entwicklung häufig eine Hyperinsulinämie im Glucosetoleranztest nachzuweisen. Noch leichter kann dies mit der nüchtern gemessenen Glucose/Insulin-Ratio festgestellt werden. Diese veränderte Stoffwechsellage kann zum Typ-II-Diabetes schon in der dritten Lebensdekade führen. (27) Nach vorläufigen Daten von *Ibanez* könnte eine Behandlung mit Insulinsensitizern dieses Risiko möglicherweise veringern, da durch wiederhergestellte Insulinsensitivität die Serumandrogen-Spiegel sinken. (3)
Teixeira et al. fanden bei ihrer Untersuchung an 23 Mädchen mit Prämaturer Pubarche bei 44% eine Insulinresistenz (88).

Ein Vorhandensein von Acanthosis nigricans ist ebenfalls im Zusammenhang mit Prämaturer Pubarche und Hyperinsulinismus beschrieben und scheint das Risiko eines späteren FOH weiter zu erhöhen. (72)
Ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko könnte durch die erhöhten Insulinkonzentrationen sowie das ungünstige Lipidprofil bestehen. (29)

Von *Sopher et al.* wurde 2001 erstmals eine Studie zum Androgeneffekt auf den Knochenbau bei Kindern mit Prämaturer Pubarche publiziert. Es stellte sich ein erhöhter Mineralsalzgehalt des Knochens und eine erhöhte Knochendichte bei Mädchen mit Prämaturer Pubarche im Vergleich zu den Mädchen der Kontrollgruppe heraus. Diese Beobachtung war unabhängig von einer möglichen Knochenalterakzelation. Allerdings wurde in dieser Studie die Knochendichte mit DXA bestimmt, die Daten sind daher nicht direkt mit den Ergebnissen unserer Arbeit vergleichbar. Als Ursache der erhöhten Knochendichte wurde aufgrund von *in vitro*-Studien angenommen, dass DHEA eine direkte stimulierende Wirkung auf die Osteoblasten ausübt. Im Gegensatz zu Testosteron haben die adrenalen Androgene aber keinen Effekt auf die Muskelmasse. Es ist nicht klar, in welchem Masse z. B. IGF-I zu dieser Wirkung beiträgt. (82)

2 Fragestellung

2.1 Wieviele der Patienten mit Prämaturer Pubarche sind tatsächlich heterozygote Carrier für CYP21-Mutationen?

Da die angegebenen Zahlen zur Heterozygotenhäufigkeit für CYP21-Mutationen bei Prämaturer Pubarche in der Literatur zwischen 0 und 40% stark schwanken, ist eine genaue Häufigkeit dieser Mutationen unter unseren Patienten mit Prämaturer Pubarche nicht bekannt.
Auch ziehen die meisten Studien Nomogramme der Hormonwerte im ACTH-Test als Grundlage der Diagnose heran, weswegen die Aussagekräftigkeit dieser Untersuchungen beschränkt ist. Nachdem in unserem Labor eine einfache und schnelle direkte Mutationsanalyse des CYP21-Gens mit der Cycle-Sequenzierung möglich wurde, stellte sich uns die Frage, wieviele der Patienten mit Prämaturer Pubarche, die in unserer endokrinologischen Abteilung des *Dr. von Haunerschen Kinderspitals* betreut werden, tatsächlich heterozygote Carrier von CYP21-Mutationen wären.

2.2 Wie verlässlich ist der ACTH-Test in der Diagnostik der Heterozygotie?

In gross angelegten Studien an Verwandten von AGS-Patienten konnte eine hohe Wahrscheinlichkeit für Heterozygotie für AGS gefunden werden, wenn der 17-OHP-Anstieg im ACTH-Test 260 ng/dl überstieg. Dabei war der Anstieg bei Heterozygoten für die SW-Form noch höher als für die SV-Form, wobei allerdings eine grosse Überlappung zwischen diesen Gruppen zu finden war. (26)
Die enorme Schwankungsbreite der Inzidenz an nicht-klassischem AGS und Heterozygotie für AGS unter den Patienten mit Prämaturer Pubarche in den verschiedenen Studien war für uns der Anlass, an unserer Patientengruppe sowohl einen ACTH-Test durchzuführen, als auch das CYP21-Gen auf Mutationen hin zu untersuchen und die molekularbiologischen Ergebnisse mit den hormonellen zu korrelieren. Damit sollte die Frage beantwortet werden, ob der Grenzwert von 260 ng/dl des 17-OHP-Anstiegs 60 Minuten nach ACTH-Stimulation, der bei Verwandten von Patienten mit AGS eine Heterozygotie nachweisen kann, auf Patienten mit Prämaturer Pubarche übertragbar ist. Sollte dies der Fall sein, müsste bei den Patienten, die einen 17-OHP-Anstieg über 260 ng/dl zeigten, auch eine Mutation im CYP21-Gen nachzuweisen sein.

2.3 Inwieweit unterscheiden sich Patienten mit normalem ACTH-Test von denjenigen mit gesteigerter 17-OHP-Antwort?

Wie in der Einleitung ausgeführt, sind bei Patienten mit Prämaturer Pubarche einige Begleiterscheinungen und Folgeerkrankungen aufgrund des mehr oder weniger stark ausgeprägten Hyperandrogenismus gehäuft beobachtet worden. Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, die Ergebnisse des ACTH-Tests mit den klinischen Untersuchungsergebnissen, besonders den Zeichen des Hyperandrogenismus und den Stoffwechselparametern zu korrelieren und herauszufinden, ob zwischen Patienten mit gesteigerter 17-OHP-Antwort und solchen mit Antworten im Normbereich Unterschiede bestehen, die deswegen die Durchführung eines ACTH-Tests zur Risikoeinschätzung rechtfertigen.

2.4 Welche Auffälligkeiten zeigt unsere Patientengruppe?

Da einige Autoren durch grossangelegte Studien, besonders *Ibanez et al.*, bereits einige Auffälligkeiten bei Patienten mit Prämaturer Pubarche nachweisen konnten, die früher nicht bekannt waren, haben wir zusätzlich untersucht, in welchen Punkten unsere Patientengruppe diese Ergebnisse bestätigen kann und ob sich neue Hinweise auf Möglichkeiten ergeben, Folgeerscheinungen des Hyperandrogenismus frühzeitig zu erkennen.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenrekrutierung

Im Zeitraum von Januar 1993 bis August 2000 wurde im *Dr. von Haunerschen Kinderspital* bei 68 Patienten die Diagnose einer isolierten Prämaturen Pubarche gestellt, darunter 60 Mädchen und acht Jungen. Alle Eltern dieser Patienten wurden im August 2000 angeschrieben und um eine Vorstellung der Kinder im Rahmen der vorliegenden Studie gebeten. In dem Brief wurden die Eltern über das geplante Untersuchungsprogramm informiert, das neben der körperlichen Untersuchung den ACTH-Test und die Knochendichtemessung einschliessen sollte. Die Familien von 13 Mädchen waren unbekannt verzogen, die übrigen Eltern wurden telefonisch kontaktiert. Die Eltern von 22 Patienten, darunter drei Jungen, lehnten eine die Studienteilnahme ab, mit den anderen wurden Termine zwischen 28.09.2000 und 10.11.2000 von 8.00 Uhr bis 10.00 Uhr vereinbart. Fünf Patienten, davon ein Junge, sind nicht zum vereinbarten Termin erschienen.

An der Studie teilgenommen haben 28 Patienten, davon 24 Mädchen und vier Jungen. Unter den Jungen war ein dizygotes Zwillingspaar.

Tabelle 1: Studienteilnahme

	Patienten mit Prämaturer Pubarche	**unbekannt verzogen**	**abgelehnt**	**nicht gekommen**	**teilgenommen**
insgesamt	68	13	22	5	28
Anteil	100 %	19 %	32 %	7 %	41 %
Mädchen	60	13	19	4	24
Jungen	8	0	3	1	4

3.2 Anamnese

Vor Ankunft der Patienten wurden folgende Daten aus der Patientenakte im Studienprotokoll festgehalten: Schwangerschaftsdauer, Geburtsgewicht, Geburtslänge, Alter bei Pubarche, Alter bei Erstvorstellung in der Klinik, Höhe, Gewicht und Knochenalter bei dieser Erstvorstellung, Höhe von Vater und Mutter sowie Alter der Mutter bei ihrer Menarche. Genau wurden auch das PH-Stadium bei Diagnose sowie weitere klinische Zeichen erhöhter Serumandrogene wie Axillarbehaarung, Akne oder adulter Schweissgeruch dokumentiert.

Die Patienten, bzw. ihre Eltern, wurden am Untersuchungstag nach ihrem Gesundheitszustand und zurückliegenden schwereren Krankheiten oder Verletzungen befragt, sowie je nach Alter nach beschleunigtem Wachstum, Gewichtsschwankungen, nach der Pubertätsentwicklung

bzw. bei präpubertären Patienten nach Veränderung der Pubesbehaarung. Es wurde nach stark fettenden Haaren und nach Pickeln oder Akne gefragt und deren eventuelle dermatologische Behandlung. Bei Mädchen nach der Menarche wurde eine Zyklusanamnese erhoben, nach der Einnahme von oralen Antikonzeptiva und dem Datum der letzen Regelblutung gefragt. Regelmässige Medikamenteneinnahme und insbesondere eine zurückliegende antiandrogene Behandlung wurden ebenfalls erfragt.

3.3 Körperliche Untersuchung

3.3.1 Internistische Untersuchung

Bei allen Patienten wurden eine Auskultation von Herz und Lunge, sowie eine Untersuchung des Abdomens durchgeführt, desweiteren eine Racheninspektion und ein palpatorischer Ausschluss vergrösserter Lymphknoten, um einen gegenwärtig guten und infektfreien Status zu attestieren.

3.3.2 Auxologie

Die Körperhöhe wurde barfuss mit dem digitalen Ulmer Stadiometer gemessen, die Messgenauigkeit betrug hier 0,1 cm.
Die Patienten wurden anschliessend, mit Unterwäsche bekleidet, mit einer digitalen Waage der Firma Seca gewogen, die Genauigkeit betrug hier 0,1 kg.
Der *Standard Deviation Score* (SDS) für die Höhe und den *Body Mass Index*, sowie das Gewicht für die Höhe in Prozent, wurden mit dem Genotropin Auxology Calculator berechnet. Für die Höhe und das Gewicht sind hier die Daten von *Prader et al* .von 1989 (65) als Referenzwerte gespeichert, für den *Body Mass Index* die von *Cole et al*. 1998 publizierten Werte. (10)

3.3.3 Erhebung des Pubertätsstatus

Die Stadien der Pubesbehaarung (PH) sowie der Brustentwicklung (B) bei Mädchen und der Genitalentwicklung (G) bei Jungen wurden nach *Marshall und Tanner* bestimmt (51, 34). Als direkter Vergleich wurden die Abbildungen im Klinikleitfaden Pädiatrie, 5. Aufl., herangezogen (34). Das Hodenvolumen der Jungen wurde orchidometrisch bestimmt.

3.3.4 Haut

Die Haut am gesamten Körper wurde genau inspiziert, besonders im Hinblick auf Seborrhoe und Acne vulgaris. Die Befunde wurden in drei Schweregrade eingeteilt, leichte, kleinfollikuläre Akne, meist an der Stirn lokalisiert, wurde als 1 gewertet, eine Ausbreitung auf die talgdrüsenreiche Haut von Gesicht, Brust und Rücken als 2, schwere papulopustulöse Akne in grossflächiger Ausprägung als 3.
Es wurde ausserdem auf adulten Schweissgeruch in der Axilla geachtet und in 3 Ausprägungen eingestuft, 0 als nicht vorhanden, 1 als leicht vorhanden und 2 als stark ausgeprägt. Bei Anwendung von Deodorant wurde die Einteilung auf anamnestische Angaben gestützt.

3.3.5 Behaarungsscore

Zur Quantifizierung der Körperbehaarung wurde die von *Gryngarten et al.* im Jahr 2000 publizierte Scoringmethode angewendet. Hierbei werden acht Körperstellen beurteilt: der Haaransatz, der Bereich zwischen den Augenbrauen, die Oberlippe, die präaurikuläre Region, der Nacken, die Präsakralregion, Arme und Beine. Die verstärkte Behaarung einer dieser Stellen wird von 1 (leicht) bis 3 (schwer) eingeteilt, die Zahlen werden zu einem Score addiert. Ein Score über 7 bei präpubertären Kindern wird als Hypertrichose gewertet (21).
Die Methode von *Gryngarten et al.* wurde anstelle des etablierten und detaillierteren Scoringsystems von *Ferriman und Gallwey* (15) gewählt, weil sie im klinischen Gebrauch sehr einfach anzuwenden ist und die ältere Methode für die Beurteilung von Hypertrichose bei erwachsenen Frauen konzipiert wurde. *Gryngarten et al.* dagegen wenden ihre Methode vor allem zur Beurteilung bei Kindern vor der Pubertät an. So kann sie auch bei Patienten mit Prämaturer Pubarche gut im Rahmen der Suche nach Effekten verfrüht erhöhter Serumandrogene benutzt werden.
Die Axillarbehaarung wurde zur Beurteilung in 4 Grade eingeteilt: 0 (nicht vorhanden), 1 (leicht), 2 (normal) und 3 (verstärkt).

3.4 Apparative Untersuchungen

3.4.1 Blutdruckmessung

Der Blutdruck wurde bei allen Patienten im Sitzen oszillometrisch gemessen, mit dem Gerät Dinamap® pro 200 der Firma Critikon. Die Genauigkeit betrug 1 mmHg.

Als Referenzwerte wurden die der *Task Force on Blood Pressure Control in Children* von 1987 herangezogen (87), die noch immer die umfassendste Zusammenfassung grosser Studien darstellt.

3.4.2 Knochendichtemessung

Die Knochendichte wurde mit peripherer quantitativer Computertomographie (pQCT) gemessen. Das verwendete Gerät war der Stratec XCT-2000 pQCT™ der Firma Stratec, Pforzheim. Der Scanner arbeitet mit niedrig-energetischer Röntgenstrahlung von 38 keV. Die Strahlendosis für eine einzelne Messung beträgt damit ungefähr 0,3 mSv, d.h. eine effektive Dosis für den Unterarm von 0,1 mSv. Eine Kalibrierung mit dem vom Hersteller mitgelieferten Phantom wurde nach jeweils zehn Messungen durchgeführt.

Zuerst wurde die Länge des nicht-dominanten Unterarms an der Ulna gemessen und der Unterarm in dem Scanner positioniert. Anschliessend wurde eine coronare Übersichtaufnahme des proximalen Handgelenks gemacht und die Stelle, die 4% der gemessenen Ulnalänge von der radialen Gelenkfläche aus am Radius entspricht, eingestellt. Falls allerdings die Wachstumsfuge in diesem Bereich lag, und somit eine erhöhte Mineraldichte zu erwarten war, wurde die Schnittebene etwas weiter distal gewählt. Durch die distale Messung bei 4 % kann die Gesamtdichte bestimmt werden, die als mittlere Dichte der Querschnittsfläche bei einer Schwelle von 280 mg/cm^3 definiert ist. Ausserdem enthält der Knochen hier metaphysäre Spongiosa, was die Bestimmung der trabekulären Dichte erlaubt. Diese wurde als mittlere Dichte der zentralen Querschnittsfläche (45% des gesamten Querschnitts) definiert. Eine zweite Messung wurde an der Stelle des Radius, die 65% der Ulnalänge vom der radialen Gelenkfläche aus entspricht, durchgeführt. Durch diese diaphysale Messung bei 65 % konnte die Kortikalisdichte bestimmt werden. Die Schwelle, bei der kortikale Knochensubstanz identifiziert wurde, betrug 710 mg/ cm^3. (57) Die Stelle am Radius, die 65% der Ulnarlänge von der radialen Gelenkfläche entfernt liegt, wurde einerseits gewählt, weil an dieser Stelle die Biegebeanspruchung gross ist und die Kortikalis somit kräftig ausgebildet ist, andererseits auch, weil in dieser Region die Unterarmmuskeln den grössten Umfang und die grösste Querschnittsfläche haben. Mit Hilfe der vom Hersteller mitgelieferten Software, Version 5.40, kann so anhand der unterschiedlichen Dichte von Knochen, Muskel und Fett zusätzlich die Muskelfläche berechnet werden.

Als Referenzdaten wurden für die distale Messung die Untersuchungen von *Neu et al.* (57) herangezogen, für die proximale Messung diejenigen von *Schoenau et al.* (77).

3.4.3 Knochenalterbestimmung

Nach der Methode von *Greulich und Pyle* wurde eine Röntgenaufnahme der linken Hand mit den Bildern im Atlas verglichen. Als Knochenalter oder biologisches Alter gilt dasjenige, mit dessen Atlasbild das Röntgenbild des Patienten am ehesten übereinstimmt. Für die zwischen den im Atlas abgebildeten Reifungsstufen sind im Atlas Tabellen angegeben, sodass das Knochenalter möglichst genau bestimmt werden kann. Ein Knochenalter von weniger als zwölf Monaten vor oder nach dem chronologischen Alter wird als normal angesehen (20).
Anhand des Knochenalters konnte die prognostische Endlänge mit Hilfe der Tabellen von *Bayley und Pinneau* (6) geschätzt werden.

3.5 Labor

3.5.1 Allgemeines Labor

Vor dem ACTH-Test wurden aus der liegenden Kanüle (siehe unten) Blutproben in verschiedene Röhrchen entnommen und die in Tabelle 2 genannten Werte bestimmt.

Tabelle 2: Allgemeines Labor

1,2 ml in EDTA	kleines Blutbild und maschinelles Differetialblutbild, HbA_1c
2 ml in Lithium-Heparinat	Elektrolyte, Eiweiss, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, Cholesterin, GOT, GPT, AP
1,2 ml in Natrium-Fluorid	Glucose und Lactat
1,2 ml für Serum	TSH und fT4
5 ml für Serum	Insulin, C-Peptid und Leptin

Ausserdem wurden 7,5 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen für die DNA-Extraktion entnommen.
Aus der Glucosekonzentration und dem Insulin-Spiegel wurde die Glucose/Insulin-Ratio berechnet. Nach *Legro et al.* liegt bei Werten unter 4,5 mg/dl : µE/ml eine Insulinresistenz nahe. Dieser Grenzwert wurde durch Vergleich einer Kontrollgruppe mit Patientinnen mit PCOS gewonnen, bei denen auch ein oraler Glucosetoleranztest durchgeführt wurde. Dieser Grenzwert der Glucose/Insulin-Ratio hat in der genannten Studie eine Sensitivität von 95%, eine Spezifität von 84%, einen positiven prädiktiven Wert von 87% und einen negativen prädiktiven Wert von 94% gezeigt. (48)
Leider sind für Kinder derzeit noch keine Referenzwerte für Leptin vorhanden. In einer Studie mit Kindern mit Prämaturer Pubarche von *l`Allemand et al.* hat sich aber mittlerweile eine Korrelation mit dem SDS-BMI gezeigt, ausserdem eine Korrelation mit dem Serum DHAS-Spiegel. Wir wollten herausfinden, ob in unserer altersmässig heterogenen Gruppe diese Korrelationen ebenfalls nachweisbar seien. (45)

3.5.2 ACTH-Test

Der Test wurde bei allen Patienten im Sitzen durchgeführt und zwischen 8.00 h und 10.00 h begonnen. Die Patienten waren grösstenteils nicht nüchtern. In eine Vena cubitalis wurde eine Venenverweilkanüle gelegt und zuerst die oben genannten Blutproben entnommen. Dann wurden 5 ml Blut für die basalen Hormonbestimmungen aus dem Serum abgenommen. Anschliessend wurden 250 µg ACTH (0,25 ml Synacthen, Ciba-Geigy, Schweiz) langsam über ca. eine Minute injiziert. Danach wurde mit physiologischer NaCl-Lösung nachgespült und die Kanüle mit verdünnter Heparinlösung (200 IE in 2 ml) geblockt. Sechzig Minuten nach der ACTH-Injektion wurde erst die Heparinlösung sowie ca. 2 ml Blut abgezogen. Danach wurden weitere 5 ml Blut zur Bestimmung der stimulierten Hormonwerte im Serum entnommen, die Kanüle wurde dann entfernt.

3.5.3 Hormonbestimmungen

Die Hormonbestimmungen wurden im Labor der endokrinologischen Abteilung des *Dr. von Haunerschen Kinderspitals* durchgeführt. Tabellarisch sind die benützen Assays und die laborinternen Daten zu Präzision und Reproduzierbarkeit angegeben.

Tabelle 3 : Ausschliesslich basal bestimmte Hormone

Hormon	Testverfahren	Firma	Intraassay variance = Präzision	Interassay variance =Reproduzierbarkeit
LH	immunenzymometrisches Assay mit monoklonalen Antikörpern und Magnettrenntechnik	Biochem, Freiburg	n = 6 $\bar{x}$ = 10,1 mU/ml SD = 0,3 mU/ml VK = 3,0 %	n = 8 $\bar{x}$ = 9,4 mU/ml SD = 0,63 mU/ml VK = 6,7 %
FSH			n = 6 $\bar{x}$ = 23,2 mU/ml SD = 0,8 mU/ml VK = 3,4 %	n = 8 $\bar{x}$ = 21,1 mU/ml SD = 1,75 mU/ml VK = 8,3 %
IGF-1	Enzyme Amplified Sensitivity Immuno Assay (EASIA)	Immunodiagnostic Systems Ltd. Boldon, Grossbritannien	n = 6 $\bar{x}$ = 99,6 ng/ml SD = 9,2 ng/ml VK = 9,2 %	n = 9 $\bar{x}$ = 134,1 ng/ml SD = 11,9 ng/ml VK = 8,9 %

Tabelle 4: Sowohl basal als auch nach ACTH-Stimulation bestimmte Steroidhormone

Hormon	Testverfahren	Firma	Intraassay variance = Präzision	Interassay variance =Reproduzierbarkeit
17-OHP	Radioimmunoassay (RIA)	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim	n = 6 $\bar{x}$ = 94,2 ng/dl SD = 7,0 ng/dl VK = 7,4 %	n = 8 $\bar{x}$ = 96,5 ng/dl SD = 14,9 ng/dl VK = 15,4 %
Cortisol	Fluoreszenz-polarisations-Immunoassay (FPIA)	ABBOT, Wiesbaden	n = 6 $\bar{x}$ = 16,4 µg/dl SD = 0,3 µg/dl VK = 1,3 %	n = 12 $\bar{x}$ = 16,4 µg/dl SD = 1,1 µg/dl VK = 6,7 %
DHEAS	immunenzymometrisches Assay mit monoklonalen Antikörpern und Magnettrenntechnik	Biochem, Freiburg	n = 6 $\bar{x}$ = 104,8 µg/dl SD = 5,9 µg/dl VK = 5,6 %	n = 7 $\bar{x}$ = 108,9 µg/dl SD = 11,3 µg/dl VK = 10,4 %
Androstendion	Radioimmunoassay (RIA)	Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim	n = 6 $\bar{x}$ = 126,5 ng/dl SD = 6,9 ng/dl VK = 5,5 %	n = 7 $\bar{x}$ = 110,9 ng/dl SD = 10,0 ng/dl VK = 9,0 %
Testosteron	Enzyme Amplified Sensitivity Immuno Assay (EASIA)	Immunodiagnostic Systems Ltd. Boldon, Grossbritannien	n = 6 $\bar{x}$ = 187,6 ng/dl SD = 10,6 ng/dl VK = 5,7 %	n = 6 $\bar{x}$ = 148,8 ng/dl SD = 18,9 ng/dl VK = 12,7 %

Als Referenzwerte wurden die *Pediatric Steroid Profiles* der Firma Endocrine Sciences, Tarzana, Kalifornien herangezogen.

3.6 Material und Methoden der DNA-Analyse

3.6.1 Material

3.6.1.1 Hersteller

Die verwendeten Chemikalien wurden in p.a.-Qualität von folgenden Herstellern bezogen: Bio-Rad (München), Biozym Diagnostik (Hess. Oldendorf), Boehringer Mannheim (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Serva Feinbiochemica (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Pharmacia (Freiburg). Es wurde die Agarose Biozym agarose DNA der Firma Biozym Diagnostik verwendet. Die Taq DNA Polymerase und die Restriktionsenzyme stammen von Boehringer Mannheim. Die Nukleosidtriphosphate wurden von Pharmacia geliefert. Die Proteinase K wurde von Sigma bezogen. Das Qiaquick PCR Purification Kit wurde von Qiagen (Hilden) bezogen. Als Synthesekit wurden das Expand™ Long Template PCR System der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Das dRhodamine Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit stammte von Perkin-Elmer. Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) sythetisiert. Es wurde der 1 kb DNA ladder Längenstandard von Gibco BRL verwendet.

3.6.1.2 Material für die DNA-Präparation

- **Erythrozytenlysepuffer**

NH_4Cl	150 mM	8,29 g
$KHCO_3$	10 mM	1,00 g
Na_2EDTA	0,1 mM	0,037 g

→ ad 1000 ml H_2O_{bidest} ; ph 7,4 mit NaOH/HCl einstellen

→ autoklavieren

- **Ethanol 100 %**
- **Ethanol 70 %**
- **NaCl 5 M**
- **Proteinase K-Puffer**

Tris/Cl ph 7,5	1 M	5 ml
EDTA	0,5 M	2 ml
NaCl	5 M	3 ml

→ ad 1000 ml H_2O_{bidest}

→ autoklavieren

- **Proteinase K**
- **SDS**

Na-Dodecylsulfat	200 g

→ ad 1000 ml H_2O_{bidest}

3.6.1.3 Material für PCR und Cycle-Sequenzierung

- **Agarose: Biozym agarose DNA**
- **Auftragspuffer 5%** für die Agarosegel- Elektrophorese

Ficoll 400	2,5 g	25 %
Bromphenolblau	0,025 g	0,25 %

- **DNA Pol Mix**

- **dNTP-Mix**

H_2O_{bidest}		60 µl
dATP	100 mM	10 µl
dTTP	100 mM	10 µl
dGTP	100 mM	10 µl
dCTP	100 mM	10 µl

→ Endkonzentration der Desoxynukleotidtriphosphate **400 µM**

- **dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit**
- **EcoRI**
- **Ethanol 100 %**
- **Ethanol 70 %**
- **Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ ml)**
- **Natriumacetat 3 M**
- **Primer**

Primer	5` Sequenz 3`	5`-Bindung	Sense	T_m
AGS-F	GCA TAT AGA GCA TGG CTG TG	-679	+	60 °C
AGS-R	CCT TCT CTG CCA GCG ATG TC	2818	-	64 °C
AGS-2R	ACC AGC CTG GGC AGC ATA GC	466	-	66 °C
AGS-4R	TGG GCC TGA GGG GCT GTG AG	1054	-	68 °C
AGS-6R	ATC ACT GGC TGT GGG CCG AG	1455	-	68 °C
AGS-7R	CCA CCG CCC TGG CCA GGT TG	1834	-	70 °C
AGS-9R	GCC TCC ACC ACA TTT TCA CG	2387	-	62 °C

- **Puffer 3**

Tris-HCl pH 9,2 (25 °C)	500 mM
$(NH_4)_2SO_4$	160 mM
$MgCl_2$	22,5 mM
DMSO	20 %
Tween®	1 %

- **Puffer H**
- **QIAquick PCR Purification Kit**
- **10 x Reaktionspuffer**
- **TaqI**
- **10 x TBE Puffer**

Tris/Cl	840 mM	510 g
Borsäure	900 mM	275 g
Na_2EDTA	20 mM	37,2 g

→ ad 5000 ml H_2O_{bidest}

→ Autoklavieren

3.6.2 Präparation der genomischen DNA aus EDTA-Blut

Die genomische DNA wurde aus Leukozyten nach der von *Miller et al.* (52) beschriebenen Methode präpariert. Dafür standen 7,5 ml EDTA-Blut zu Verfügung.

3.6.2.1 Lysierung der Erythrozyten

Die 7,5 ml EDTA-Blut wurden in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt, mit Erythrozyten-Lysepuffer auf ein Endvolumen von 50 ml aufgefüllt und durch sanftes Wenden gemischt. Bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension bis zur vollständigen Lyse der Erythrozyten inkubiert, die durch eine lackartige Rotfärbung zu erkennen ist.
Anschliessend wurden die Leukozyten bei 1000 U/min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und der Überstand mit den lysierten Erythrozyten dekantiert. Das Pellet wurde in Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und der Lyse- und Zentrifugationsschritt zweimal wiederholt.

3.6.2.2 Lysierung der Leukozyten und Proteinase K-Verdau des Zell-Lysats

Das Pellet wurde in 1 ml Proteinase K-Puffer aufgenommen, anschliessend mit 5 µl Proteinase K und 50 µl SDS 20% versetzt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
Das Detergenz SDS wurde zur Zerstörung der leukozytären Zellmembran zugesetzt, die Proteinase K zur Verdauung der vorhandenen Proteine, speziell der Histone, wodurch die genomische DNA aus ihrer Verpackung gelöst wurde.

3.6.2.3 Aussalzung der Proteine, Fällen, Waschen und Lösen der DNA

Nach der Proteolyse durch die Proteinase K wurden die Proteine durch Zugabe von 300 µl 5 M NaCl-Lösung denaturiert und maximal 15 sec auf dem Vortex durchmischt. Es folgte eine zehnminütige Abzentrifugation der Proteine bei 5000 U/min und das Dekantieren des DNA-haltigen Überstands in ein neues, steriles 50 ml Röhrchen.
Unter Zugabe von 2 bis 2 ½ Volumina 100%igem Ethanol und mehrmaligem, vorsichtigem Kippen des Röhrchens fiel die DNA als weisser Faden aus. Dieser konnte mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäss mit Schraubverschluss überführt werden, das mit 200 µl 70%igem Ethanol gefüllt war, um die DNA zu waschen. Der Ethanol wurde anschliessend abgenommen. Nach einstündigem Verdampfen des restlichen Alkohols wurde die genomische DNA in TE-Puffer gelöst. Zur vollständigen Lösung der DNA blieben die Proben über Nacht bei Raumtemperatur stehen und wurden anschliessend bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.6.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA besitzt ein Absorbtionsmaximum bei 260 nm, was zur Bestimmung ihrer Konzentration durch spektralphotometrische Messung ausgenutzt wurde. Dazu wurde die in TE-Puffer gelöste DNA 1:100 in H_2O_{bidest} verdünnt und durchmischt. Die DNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von λ = 260 nm in einer Quarzküvette photometrisch gegen H_2O_{bidest} gemessen.

Die DNA-Konzentration wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\mathbf{E_{260} \bullet \varepsilon \bullet VF = DNA\text{-}Konzentration\ in\ \mu g/\mu l}$$

E_{260}: Extinktion bei 260 nm

ε: Extinktionskoeffizient (für DNA: 50)

VF: Verdünnungsfaktor, hier 100

Der optischen Dichte (OD) von 1 entspricht bei 260 nm somit eine Konzentration von 50 µg/ml DNA.

Zur Qualitätsüberprüfung der Präparation musste ausserdem der Gehalt an Proteinen bestimmt werden. Da das Absorbtionsmaximum von Proteinen im Unterschied zur DNA bei 280 nm liegt, konnte aus dem Quotienten OD_{260} / OD_{280} der Reinheitsgrad der DNA abgeleitet werden. Dieser Quotient liegt für reine DNA bei 1,8.

3.6.3 Amplifikation und Sequenzierung des CYP21-Gens

Bei den 9 Patienten, bei denen ein abnormer ACTH-Test vorlag (Gruppe 2), wurde das CYP21-Gen mit der von *Krone et al.* publizierten Methode auf die zehn häufigsten Mutationen, die bei Patienten mit Adrenogenitalem Syndrom vorkommen, untersucht (43). Dazu wurde das CYP21-Gen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach *Mullis et al.* (56, 74) amplifiziert. Anschliessend wurde eine Taq-Cycle-Sequenzierung durchgeführt.

3.6.3.1 Quantitativer restriktionsenzymatischer Verdau

Vor der Amplifikation des CYP21-Gens wurde die genomische DNA in einem quantitativen Restriktionsverdau mit TaqI zerlegt. Dazu wurden 10 µg genomische DNA mit dem mitgelieferten 10 x Reaktionspuffer und 3 U/ µl TaqI in einem Volumen von 10 µl für zwei Stunden bei 65 °C inkubiert. Um eine quantitative Verdauung zu erreichen, wurden nochmals 3 U/ µl Enzym mit H_2O_{bidest} und 10 x Reaktionspuffer hinzugegeben und die DNA bei 65 °C über Nacht verdaut.

Das Ergebnis wurde auf einem 1%igen TBE-Gel ausgewertet.

3.6.3.2 PCR-Amplifikation

Für die Amplifikation des CYP21-Gens wurde das **Expand™ Long Template PCR System** verwendet. Dieses System ist für die Amplifikation langer PCR-Produkte konzipiert worden. Es besteht aus einer Mischung von Taq und Pwo DNA-Polymerase (DNA Pol Mix). Durch die Exonukleaseaktivität der Pwo wird die Fehlerrate bei der Amplifikation vermindert.
Die PCR wurde in folgendem Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt:

Puffer 3		5 µl
dNTP-Mix		2 µl
AGS-F	50 ng/ µl	1 µl
AGS-R	50 ng/ µl	1 µl
DNA Pol Mix	2,5 U	1 µl
quantitativ verdaute gDNA	200 ng	x µl
H_2O_{bidest}		ad 50 µl

Der Ansatz wurde unter folgenden Bedingungen inkubiert:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94°C	30 sec	30 x
Annealing	53 °C	30 sec	
Extension	68 °C	3 min	
Auffüllreaktion	68 °C	7 min	1 x

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in einem EcoRI-Verdau kontrolliert. Es wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl des mitgelieferten Puffers H, 1 µl EcoRI und 7 µl H_2O_{bidest} 1 h bei 37 °C inkubiert und anschliessend auf einem 1%igen TBE-Gel aufgetrennt.
Dazu wurde der 10 x TBE-Puffer 1 : 10 verdünnt und zu 2000 ml des verdünnten Puffers 60 µl des 1%igen Ethidiumbromids zugegeben, was einer Endkonzentration an Ethidiumbromid von 0,3 µg/ml entspricht. Für das Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml ethidiumbromidhaltigem TBE-Puffer durch Kochen aufgelöst und nach ausreichender Abkühlung in einen Gelträger gegossen. Das Gel wurde mit TBE-Puffer überschichtet. Jeweils 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 2 µl Auftragspuffer versetzt und in die Geltaschen eingebracht. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 100 mV über 30-60 min. Das Ergebnis wurde unter UV-Licht fotografiert.
Vor der direkten DNA-Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem **QIAquick PCR Purifikation Kit** nach Protokoll des Herstellers gereinigt, anschliessend wurden sie ein weiteres Mal auf einem 1%igen TBE-Gel kontrolliert.

3.6.3.3 Cycle-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde mit der **ABI Dye Terminator Technik** mit **nested** Primern durchgeführt. Bei dieser Kettenabbruchmethode wird die Taq-DNA-Polymerase benutzt. Die Markierung erfolgt durch Einbau von fluoreszenzmarkierten ddNTPs (Dye-Terminatoren) am 3`Ende der DNA-Vorlage. Bei der automatischen Sequenzierung werden die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente während ihrer Auftrennung über ein Polyacrylamid-Gel durch einen Laser angeregt und direkt *online* detektiert. Das emittierte Signal wird von dem angeschlossenen Computer zu einem Signal verrechnet.

In der Cycle-Sequenzierungs-PCR wurden ca. 200 ng DNA (PCR-Produkt) eingesetzt, folgende Primer wurden in einer Konzentration von 50 ng/µl verwendet:

AGS-2R, AGS-4R, AGS-6R, AGS-7R, AGS-9R und AGS-R.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl folgendermassen durchgeführt:

dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit		4 µl
Primer	50 ng/µl	1 µl
DNA	200 ng/µl	x µl
H_2O_{bidest}		ad 10 µl

Der Ansatz wurde unter folgenden Reaktionsbedingungen inkubiert:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 sec	25 x
Annealing	55 °C	15 sec	
Extension	60 °C	4 min	

Da die Dye Terminatoren nicht vollständig eingebaut wurden, musste man diese nach der Sequenzierungsreaktion aus dem Ansatz entfernen, um ein unspezifisches Fluoreszenzsignal in der Elektrophorese zu vermeiden. Die Reinigung erfolgte mit der Ethanol-Präzipitationsmethode. Hierzu wurden in einem 1,5 ml grossen Eppendorf-Reaktionsgefäss 5 µl PCR-Produkt mit 12,5 µl 100%igem Ethanol und 0,5 µl 3 M Natriumacetat versetzt und 30 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde vorsichtig, ohne die Spitze des Gefässes zu berühren, abgenommen und es wurden 100 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Die Gefässe wurden weitere 15 min zentrifugiert, die Flüssigkeit wie beschrieben abgenommen und die Restfeuchtigkeit über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C verdampft.

Die Gefässe wurden verschlossen an die Firma Medigenomix GmbH (Martinsried) geschickt, wo die Sequenzierungsprodukte auf einem **ABI PRISM 377 DNA Sequencer** elektro-

phoretisch aufgetrennt wurden. Die DNA-Sequenzen wurden von *Dr. N. Krone* auf einem Power Macintosh mit der **ABI PRISM Sequence Navigator ver. 1.0.1** Software ausgewertet.

3.6.4 Darstellung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Die RFLP-Analyse diente der Suche nach einer grossen Deletion bzw. grossen Genkonversion des CYP21-Gens. Diese Untersuchung wurde bei 27 Patienten von *Dr. E. Keller* nach der in ihrer Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie beschriebenen Methode im *Labor für Immungenetik der Kinderpoliklinik* durchgeführt. (37)

3.6.4.1 Restriktionsenzymatischer Verdau der genomischen DNA

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme TaqI, EcoRI und Bgl II wurde die genomische DNA in definierte Fragmente zerlegt. Anschliessend wurde der Verdau auf einem Agarosegel kontrolliert. War der Verdau komplett, wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt, der Reaktionsansatz auf ein Volumen von ca. 20 µl eingeengt, mit succrosehaltigem Blaumarker versetzt und eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt.

3.6.4.2 Gelelektrophorese

In einer Gelkammer mit ethidiumbromidhaltigem Agarosegel wurden die DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die DNA-Proben unter TEA-Puffer neben einem Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 30 Volt über einen Zeitraum von 38 h bis 40 h. Der Gellauf wurde anschliessend unter UV-Licht kontrolliert und fotografiert. Die gespaltene DNA sollte als durchgehender Schlier zu erkennen sein, die Laufstrecke bestimmter Markerbanden dienten als Mass dafür, ob die nachzuweisenden DNA-Fragmente weit genug aufgetrennt wurden.

3.6.4.3 Southern Blotting

Um die aufgetrennten DNA-Restriktionsfragmente analysieren zu können, wurden sie auf eine Nylonmembran transferiert, d. h. geblotted (83).

Das Gel wurde zunächst mit einer HCl-Lösung zur Depurinierung der DNA behandelt, wodurch der Transfer grösserer DNA-Fragmente erleichtert werden sollte. Danach wurde das Gel gewaschen und mit einer NaOH-Lösung zur Denaturierung der DNA behandelt. Die Übertragung der nun einzelsträngigen DNA erfolgte durch einfache Diffusion (50). Mittels Papierbrücken wurde der Transferpuffer durch das Gel und die Membran in die trockene obere Papierschicht gesaugt, wobei die DNA aus dem Gel gelöst und an die Nylonmembran gebun-

den wurde. Dadurch ergab sich auf der Membran ein genaues Abbild des DNA-Fragment-Musters auf dem Gel. Die Membran wurde zur Entfernung von Agaroseresten gewaschen und anschliessend getrocknet. Eine stärkere Bindung der DNA an die Membran wurde durch UV-Bestrahlung erzielt.

3.6.4.4 Hybridisierung mit sequenzspezifischen DNA-Sonden

Bei der Hybridisierung binden radioaktiv markierte, sequenzspezifische DNA-Sonden an komplementäre DNA-Sequenzen auf der Membran. Die Hybridisierungsprodukte können durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Es wurden Sonden für das CYP21-Gen (enthält bis auf die ersten 15 bp die gesamte codierende Sequenz des CYP21-Gens, sowie 3` flankierende Sequenzen), sowie für das C4-Gen (spezifisch für das 5` Ende beider C4-Gene C4A und C4B) eingesetzt. Hierbei handelte es sich um die Sonden, die auch im Rahmen des 10. Internationalen Histokompatibilitätsworkshops 1987 verwendet wurden.

Die DNA-Sonden wurden nach Denaturierung durch Kochen mit Hilfe der „Hexamer-Zufallsprimer“-Methode (14) radioaktiv markiert. Die radioaktive Markierung mit P^{32} wurde durch Messung der spezifischen Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Vor der Hybridisierung wurde die Membran in Prähybridisierungslösung inkubiert. Dazu musste die Membran in eine Folie eingeschweisst und die Lösung luftblasenfrei eingefüllt werden. Während der Prähybridisierung wurden die Stellen auf der Membran, die unspezifisch DNA banden, mit Lachssperma-DNA, SDS und Komponenten der Denhardt-Lösung abgesättigt.

Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierung durch Hybridisierungslösung ersetzt und die radioaktiv markierte DNA-Sonde zugesetzt, die vorher durch Kochen und Abkühlen denaturiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran zur Entfernung überschüssiger Radioaktivität gewaschen und anschliessend getrocknet. Zur Detektion der Hybridisierungsprodukte wurde die Membran in eine dünne Folie eingeschweisst und zusammen mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenfilmkassette zwischen zwei Verstärkerfolien über Nacht bei –80 °C exponiert. Je nach Stärke des über Nacht erreichten Signals wurde die Membran für weitere drei bis zehn Tage exponiert.

3.6.5 Mutationsanalyse mittels Oligonukleotid-Hybridisierung

Von *Dr. E. Keller* wurden bei 27 Patienten ebenfalls eine Analyse der zehn häufigsten oben aufgeführten Punktmutationen durch PCR und Oligonukleotid-Hybridisierung durchgeführt. Dazu wurden vier CYP21-spezifische PCR-Fragmente amplifiziert.

Fragment	5` Primer 3`
Fragment 1: Exon 1 bis Exon 3	P1: TGG AAC TGG TGG AAG CTC CGG[a]
	P2: AGC AGG GAG TAG TCT CCC AAG[a]
Fragment 2: Exon 3 bis Exon 8	P3: CTG TCC TTG GGA GAC TAC TCC[a]
	P4: GCT CGG GCT TTC CTC ACT CAT[a]
Fragment 3: Exon 3 bis Exon 10[b]	P3: CTG TCC TTG GGA GAC TAC TCC[a]
	P11: GGA GCA ATA AAG GAG AAA CTG A[c]
Fragment 4: Exon 2 bis Exon 6	PM: GTG GTG CTG AAC TCC AA[d]
	PCr: GCA TCT CCA CGA TGT GA[d]

[a]: nach *Speiser et al.* (84)
[b]: zur Identifikation der Pro453Ser Mutation in Exon 10
[c]: nach *Wedell et al.* (92)
[d]: nach *Owerbach et al.* (62)

Die PCR wurde in einem Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl durchgeführt, der 25 pmol Primer, 20 nmol dNTPs, 2,5 U Taq Polymerase, Puffer (10 mM Tris/ HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01% Gelatine) und 0,5- 1µg DNA enthielt. Für die Amplifikation der Fragmente 2 und 3 wurde ausserdem 1% DMSO dazugegeben.

Es wurde eine Zweistufen-PCR mit folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt:

Für Fragment 1 und 2

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Anfangsdenaturierung	94 °C	10 min	1 x
Denaturierung	94 °C	1 min	5 x
Annealing	63 °C	30 sec	
Extension	72 °C	2 min	
Denaturierung	94 °C	1 min	30 x
Annealing	59 °C	30 sec	
Extension	72 °C	2 min	

Für Fragment 3 wurden 5 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 58 °C und 30 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 54 °C durchgeführt, für Fragment 4 8 Zyklen bei 58 °C und 25 Zyklen bei 54 °C.

Die PCR-Produkte wurden auf Nylonmembranen gebracht und mit Digoxigenin-markierten Oligonukleotiden hybridisiert, die mit mutierten und normalen Sequenzen im CYP21-Gen korrespondieren. Die Technik der Hybridisierung und anschliessenden Chemilumineszenz-detektion wurde nach *Nevinny-Stickel et al.* durchgeführt (58,59).

Verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung[a]	5` Sequenz 3`	Spezifität
30A[b]	CCA CCT CCT GCC TCT TG	P30L Exon 1
30B[b]	CCA CCT CCC GCC TCT TG	
SplA(ING)[b]	AGC CCC CAG CTC CTC CT	splice site, Intron 2
SplB(INA)[b]	AGC CCC CAA CTC CTC CT	
SplB(INC)[b]	AGC CCC CAC CTC CTC CT	
DelA[c]	GAG CAG TAG TCT CCC AAG GAC	8bp Deletion, Exon 3
DelB[c]	GGG AGT AGT CTC CCA AGG AC	
172A	GCA GCA TCA ACT GTT ACC T	I172N, Exon 4
172B	GCA GCA TCA TCT GTT ACC T	
234-239A[d]	CTG CTT CTC CTC GTT GTG GTC	Cluster Punkt-mutationen, Exon 6
234-239B[d]	CTG CAT CTC CAC GAT GTG ATC	
281A[e]	AAG GGC ACT TGC ACA TG	V281L Exon 7
281B[e]	AAG GGC ACG TGC ACA TG	
307A[c]	GTG AAG CAA AAA AAA CCA CG	T Insertion, Exon 7
307B	GTG GTT TTT TTG CTT CAC CA	
318A[b]	AGC GAC TGT AGG AGG AG	Q318 Stop, Exon 8
318B[b]	AGC GAC TGC AGG AGG AG	
356A	GCG CCT GTG GCC CGT T	R356W, Exon 8
356B	GCG CCT GCG GCC CGT T	
453Ser	CGC TGC TGC CCT CCG GG	P453S, Exon 10
453Pro	CGC TGC TGT CCT CCG GG	

a: ein A zeigt die Zugehörigkeit zum Pseudogen CYP21P an (auch als CYP21A bezeichnet), ein B die Herkunft vom funktionellen CYP21-Gen (auch CYP21B genannt). (25, 96, 69).
[b]: nach *Helmberg et al.* (24)
[c]: nach *Mornet et al.* (55)
[d]: nach *Amor et al.* (1)
[e]: nach *Owerbach et al.* (62)

3.7 Statistische Methoden

Aufgrund der kleinen Patientenzahl konnte nicht von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden. Trotzdem wurden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zusätzlich zur nicht-parametrischen Darstellung in Mittelwerten und Standardabweichungen angegeben, um einen besseren Vergleich mit anderen Studien zu ermöglichen.

Die statistische Datenanalyse wurde aber ausschliesslich mit nicht-parametrischen Tests durchgeführt. Um Unterschiede der zwei Gruppen zu untersuchen wurde der Mann-Withney-U-Test angewendet, für deren graphische Darstellung wurden Box-Plots gewählt. Der Median ist als Strich in der Box dargestellt, in der Box liegen Werte innerhalb der 25. und 75. Perzentile. Längs ist durch einen Strich der Bereich von eineinhalb Perzentilenabständen dargestellt, der abschliessende Querstrich stellt den letzten Wert dar, der noch in diesem Bereich liegt, der Längsstrich kann daher auch kürzer als der eineinhalbfache Interperzentilenabstand sein. Ausreisser sind Werte, die mehr als anderthalb (Kreise) bzw. drei (Sternchen) Boxlängen von der oberen bzw. unteren Boxkanten entfernt sind.

Zur Untersuchung von Korrelationen wurde der Spearman-Korrelationstest benutzt, bei dem die graphische Darstellung durch einfache Streudiagramme erfolgt.
Mit dem T-Test für einfache Stichproben wurde untersucht, ob sich die standardisierten Daten der gesamten Patienten im Mittel von 0 unterscheiden, d. h. ob sie von der Norm abweichen. Hier wurden Histogramme zur graphischen Veranschaulichung gewählt. Bei diesen wurde auf der x-Achse der SDS aufgetragen, auf der y-Achse die Anzahl der Patienten, so dass eine Abweichung von der Gauss`schen Normalkurve auf den ersten Blick ersichtlich ist.
Für die statistische Auswertung wurde mit SPSS für Windows, Version 10.1, gearbeitet.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind im folgenden in Mittelwerten und Standardabweichungen angegeben, die vollständige Tabelle der Rohdaten sowie der standardisierten Einzeldaten ist im Anhang zu finden. Die Patienten sind in der Tabelle nach steigendem 17-OHP-Anstieg im ACTH-Test angeordnet, d. h. Patient 1 hatte den niedrigsten, Patient 28 den höchsten 17-OHP-Anstieg. Da einige Daten nicht bei allen Patienten ermittelt werden konnten, ist die jeweilige Anzahl der vorliegenden Werte in Klammern angegeben.

4.1 Definition der zwei Gruppen

Nach der von *Knorr et al.* festgelegten Grenze des 17-OHP-Anstiegs von 260 ng/dl 60 min nach ACTH- Stimulation wurden die Patienten der vorliegenden Studie in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 umfasst alle Patienten, die mit ihrem 17-OHP-Anstieg im Normbereich von Mittelwert $\pm$ 2 SD gesunder Probanden liegen, d. h. unter 260 ng/dl. Diese Gruppe enthält 19 Patienten, Patient 1 bis 19. In Gruppe 2 wurden alle Patienten eingeteilt, die mit ihrem 17-OHP-Anstieg über 260 ng/dl lagen, das waren 9 Patienten, Patient 20 bis 28. (39)

4.2 Anamnestische Daten

4.2.1 Geburtsanamnese

In der Gruppe 1 (n=14) fanden sich vier Frühgeburten, darunter die Zwillinge, die in der 35. SSW zur Welt kamen. In Gruppe 2 (n=9) fand sich dagegen keine Frühgeburt.
Insgesamt war nur einer der Zwillinge aus Gruppe 1 *„small for gestational age“* (SGA), d. h. er lag mit dem Geburtsgewicht unter der 10. Perzentile. (46).

4.2.2 Status bei Erstdiagnose

Tabelle 5: Auxologische Daten bei Erstvorstellung [a]

	SDS Höhe	SDS mittlere familiäre Zielgrösse	SDS Höhe bezogen auf Knochenalter	Knochenalter-vorsprung (Verhältnis CA/BA[b])	SDS prognostische Endlänge
Gesamt	0,47 ±1,13 (n=28)	0,0 ± 0,9 (n=28)	-0,62 ±0,94 (n=21)	1,13 ±0,10 (n=21)	-0,43 ±1,08 (n=16)
Gruppe 1	0,74 ±1,01 (n=19)	0,1 ± 0,9 (n=19)	-0,49 ±0,88 (n=15)	1,14 ±0,10 (n=15)	-0,14 ±0,83 (n=10)
Gruppe 2	-0,08 ±1,17 (n=9)	-0,3 ± 0,6 (n=9)	-1,21 ±0,83 (n=6)	1,12 ±0,07 (n=6)	-0,92 ±1,25 (n=6)

[a] alle Werte als Mittelwerte ±SD
[b] CA = *chronological age*, BA = *bone age*

Nach Tabelle 5 schienen die Patienten der Gruppe 1 eher grösser als die der Gruppe 2 gewesen zu sein, ein Eindruck, der sich noch verstärkt, wenn die Standardisierung nach dem Knochenalter, das heisst nach dem biologischen Alter erfolgt, auch wenn in beiden Gruppen das Knochenalter in ähnlichem Ausmass akzeleriert war. Der Unterschied war nicht signifikant, die Tendenz ist aber aus den Abbildungen 2 und 3 zu ersehen.

Abbildung 2: Unterschied in SDS Höhe bei Erstvorstellung

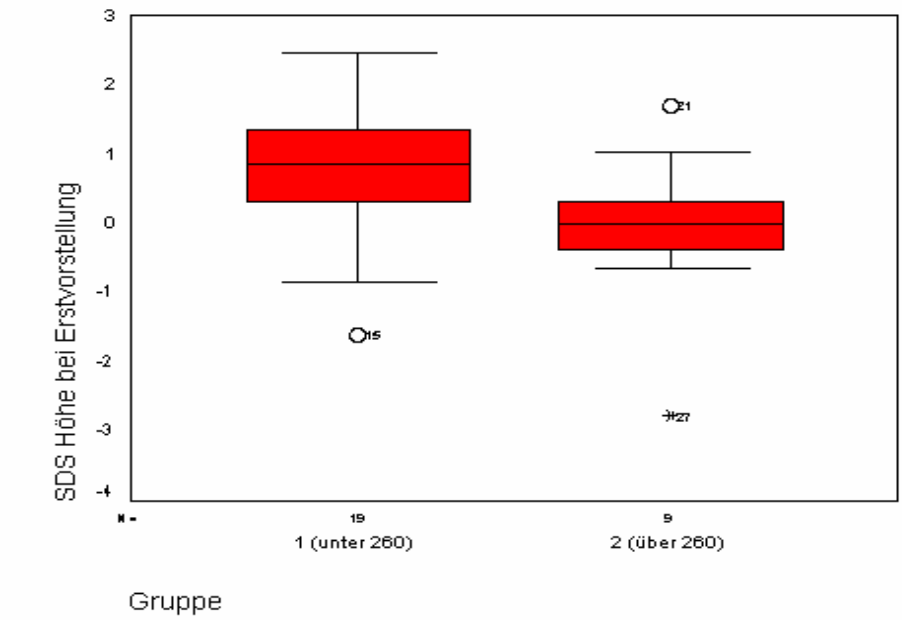
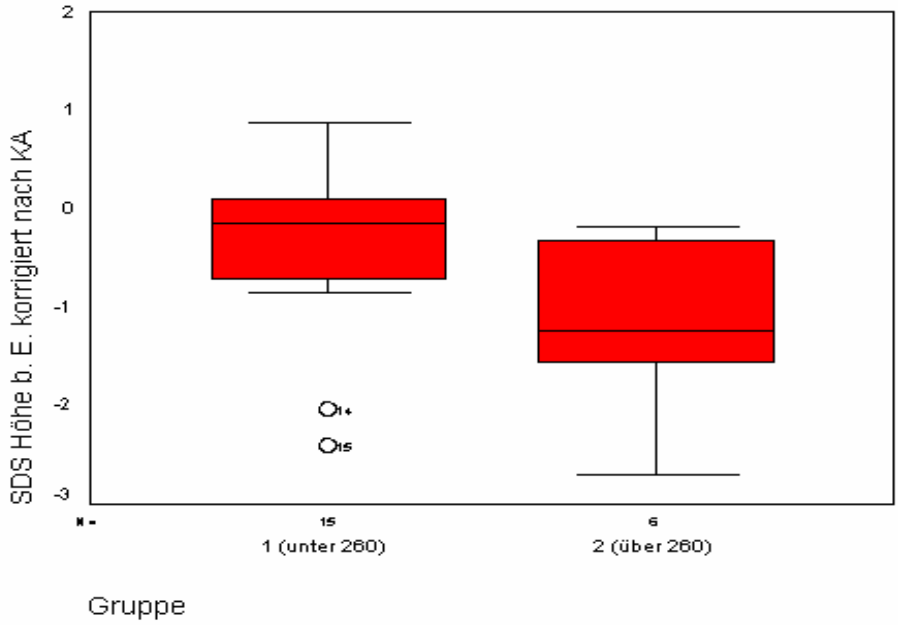


Abbildung 3: Unterschied in SDS Höhe bei Erstvorstellung korrigiert nach Knochenalter



Die Latenz zwischen dem Auftreten von Schamhaaren, also der Pubarche, und der Diagnose in der Klinik betrug für alle Patienten 0,73 ±0,77 Jahre, für Gruppe 1 0,60 ±0,74 Jahre und für Gruppe 2 1,01 ±0,78 Jahre. Hierin wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen gefunden.

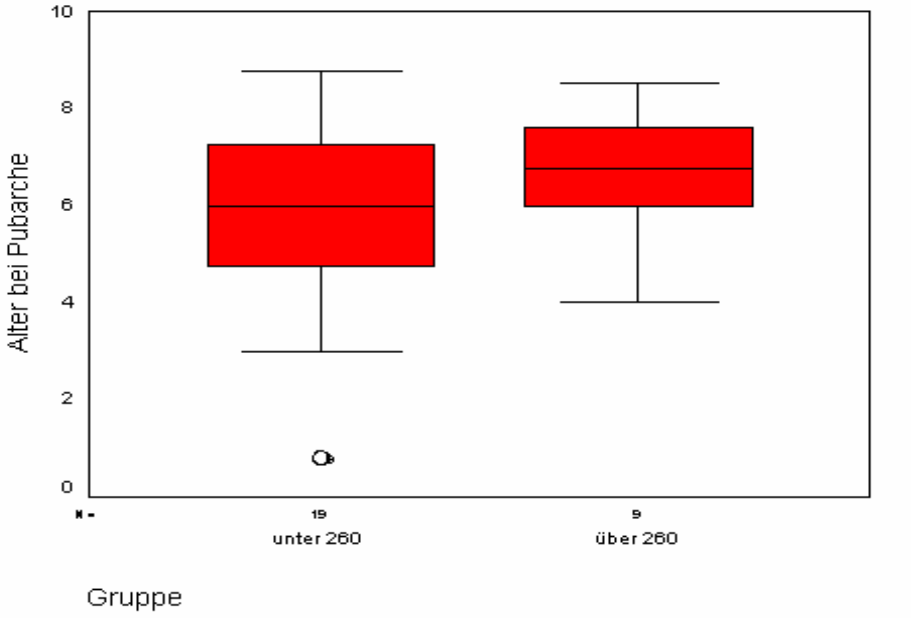
Tabelle 6: Klinische Zeichen des Androgenexzesses

	Alter bei Pubarche[a] (a)	vorhandene Axillarbehaarung[b]	vorhandener adulter Schweissgeruch[b]
Gesamt	6,04 ±1,76 (n=28)	10 (=36%) (n=28)	4 (=14%) (n=28)
Gruppe 1	5,81 ±1,91 (n=19)	4 (=21%) (n=19)	3 (=16%) (n=19)
Gruppe 2	6,52 ±1,26 (n=9)	6 (=67%) (n=9)	1 (=11%) (n=9)

[a] Mittelwerte ±SD
[b] Anzahl der Patienten mit dem Merkmal

Ein signifikanter Unterschied bestand im Vorhandensein von Axillarbehaarung, die bei Gruppe 1 in nur 21% der Fälle vorhanden war, bei Gruppe 2 dagegen in 67% der Fälle (Z=2,407, p=0,016). Schweissgeruch wurde in ähnlich niedrigem Prozentsatz der Fälle festgestellt.
Auch wenn die Pubarche scheinbar bei Gruppe 1 früher auftrat, so ist doch kein signifikanter Unterschied vorhanden, Abbildung 4 veranschaulicht dies.

Abbildung 4: Auftreten der Pubarche



4.3 Körperliche Untersuchungsbefunde

4.3.1 Internistische Untersuchung

Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bei guter Gesundheit.

4.3.2 Auxologische Daten

Tabelle 7: Auxologische Daten bei Untersuchung

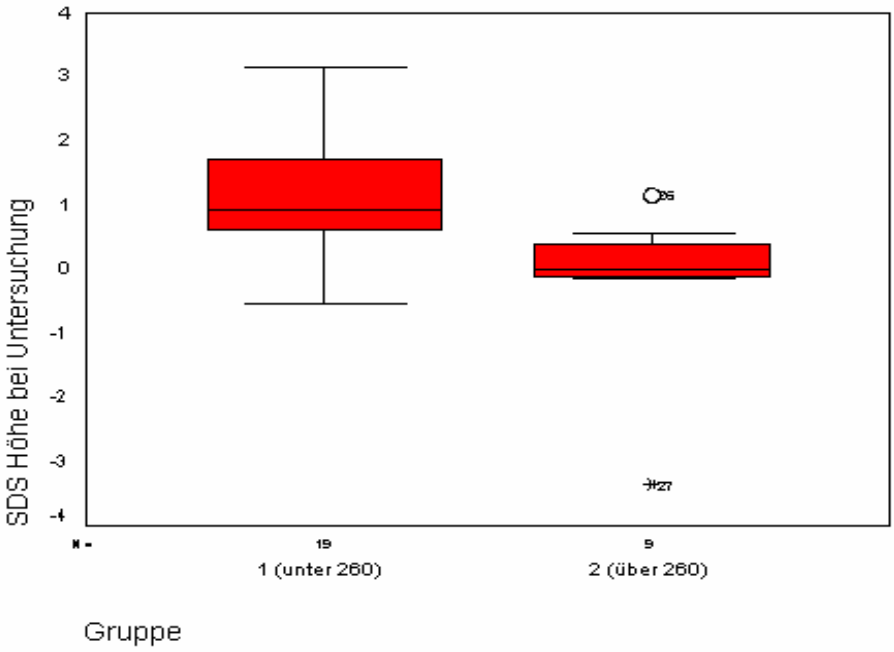
	Alter (a)	Höhe (cm)	SDS Höhe	SDS prognostische Endlänge	BMI (kg/m^2)	SDS-BMI
Gesamt	11,33±3,46 (n=28)	147,85±16,87 (n=28)	0,73±1,19 (n=28)	0,0±0,8 (n=9)	19,31±3,58 (n=28)	0,47±1,28 (n=28)
Gruppe 1	11,22±3,37 (n=19)	149,95±17,05 (n=19)	1,15 ±0,92 (n=19)	0,1 ±0,8 (n=7)	18,88±3,50 (n=19)	0,32±1,29 (n=19)
Gruppe 2	11,56±3,63 (n=9)	143,43±16,54 (n=9)	-0,17±1,20 (n=9)	-0,5±0,2 (n=2)	20,22± 3,78 (n=9)	0,79 ±1,19 (n=9)

Die beiden Gruppen zeigten keinen Unterschied in der Altersverteilung. Auch der Body Mass Index lag bei beiden Gruppen im gleichen Rahmen, die Absolutwerte unterschieden sich in den beiden Gruppen nicht. Andere Untersuchungen haben einen erhöhten SDS-BMI bei Kindern mit Prämaturer Pubarche gefunden (45). Wir konnten bei unseren Patienten weder bei

Erstvorstellung noch zum Untersuchungszeitpunkt einen signifikant erhöhten SDS-BMI feststellen.

Auch in der Höhe unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant in den Absolutwerten. Allerdings waren die Patienten der Gruppe 2 bezogen auf altersentsprechende Normwerte, also im SDS, signifikant kleiner als die der Gruppe 1 (Z=2,830, p=0,005) (Abbildung 5). Die auf das Knochenalter bezogenen Werte konnten statistisch nicht verwertet werden, da nur bei strenger Indikation ein Röntgenbild der linken Hand angefertigt wurde und somit nur bei wenigen Patienten ein Knochenalter bestimmt wurde.

Abbildung 5: SDS Höhe bei Untersuchung



4.3.3 Pubertätsstatus, Behaarung und Haut

Tabelle 8: Zeichen der Pubertätsentwicklung und des Androgeneinflusses

	Alter (a)	PH[a, b]	Vorhandene Axillarbe-haarung[b,c]	adulter Schweiss-geruch[d]	Behaa-rungsscore[e]	Akne[d]
Gesamt (n=28)	11,33 ±3,46	2: 4 (=14%) 3: 12 (=43%) 4: 2 (=7%) 5: 4 (=14%) 6: 6 (=21%)	0: 6 (21%) 1: 7 (25%) 2: 8 (29%) 3: 7 (25%)	0: 7 (25%) 1: 8 (29%) 2: 13 (46%)	≤7:24(86%) ≥7:4(14%)	0: 17 (61%) 1: 6 (21%) 2: 2 (7%) 3: 3 (11%)
Gruppe 1 (n=19)	11,22 ±3,37	2: 3 (=16%) 3: 7 (=37%) 4: 2 (=11%) 5: 3 (=16%) 6: 4 (=21%)	0: 4 (21%) 1: 5 (26%) 2: 6 (32%) 3: 4 (21%)	0: 4 (21%) 1: 6 (32%) 2: 9 (47%)	≤7:17(89%) ≥7: 2(11%)	0: 12 (63%) 1: 5 (26%) 2: 1 (5%) 3: 1 (5%)
Gruppe 2 (n=9)	11,56 ±3,63	2: 1 (=11%) 3: 5 (=56%) 4: 0 (=0%) 5: 1 (=11%) 6: 2 (=22%)	0: 2 (22%) 1: 2 (22%) 2: 2 (22%) 3: 3 (33%)	0: 3 (33%) 1: 2 (22%) 2: 4 (44%)	≤7:7(78%) ≥7:2 (22%)	0: 5 (56%) 1: 1 (11%) 2: 1 (11%) 3: 2 (22%)

[a] Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen PH-Stadium nach *Tanner* (51)
[b] aufgrund der Aufrundung auf ganze Kommastellen ergibt die Summe der Prozentangaben nicht immer 100%
[c] Einteilung siehe Abschnitt 3.3.5
[d] Einteilung siehe Abschnitt 3.3.4
[e] Erläuterung in Abschnitt 3.3.5

Aus der Tabelle 8 ist ersichtlich, dass beide Gruppen zum Untersuchungszeitpunkt einen vergleichbaren Altersdurchschnitt aufwiesen. Bezüglich der klinisch evaluierten Zeichen des Androgeneinflusses in Form der Pubesbehaarung, der Axillarbehaarung, des adulten Schweissgeruches, der Körperbehaarung und vorhandener Akne unterschieden sich die beiden Gruppen nicht signifikant voneinander.

4.4 Apparative Untersuchungsergebnisse

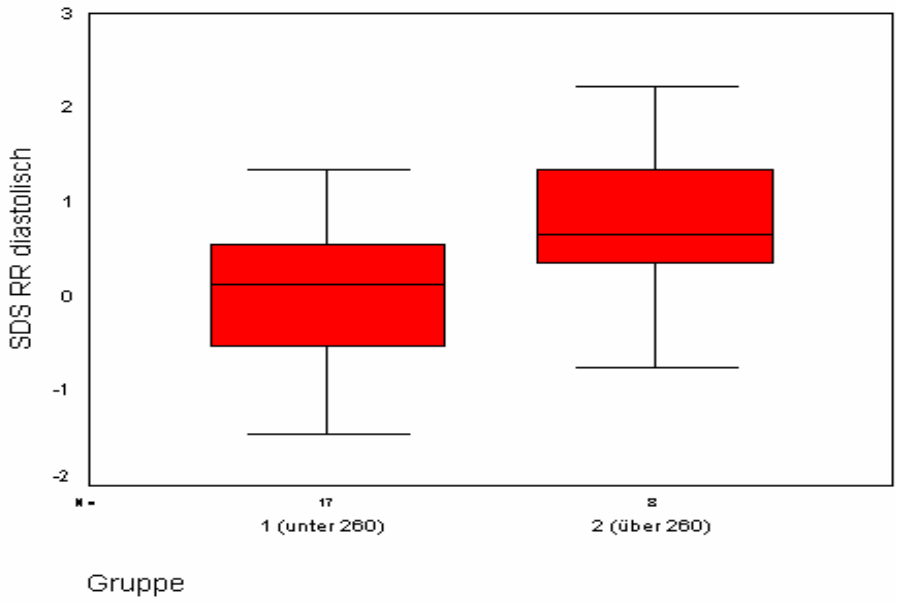
4.4.1 Blutdruck

Tabelle 9: Vergleich der arteriellen Blutdruckwerte

	RR systolisch (mmHg)	SDS RR systolisch	RR diastolisch (mmHg)	SDS RR diastolisch
Gesamt (n=25)	110 ± 12	0,67 ± 0,91	67 ± 9	0,26 ± 0,86
Gruppe 1 (n=17)	109 ± 10	0,57 ± 0,74	64 ± 8	0,03 ± 0,76
Gruppe 2 (n=8)	113 ± 15	0,89 ± 1,16	72 ± 10	0,77 ± 0,83

Die systolischen Blutdruckwerte waren bei beiden Gruppen vergleichbar. Allerdings hatten die Patienten der Gruppe 2 im Durchschnitt einen signifikant höheren diastolischen Blutdruck (Z=1,922, p=0,05). Abbildung 6 veranschaulicht dies.

Abbildung 6: Diastolischer Blutdruck



4.4.2 Knochendichte

Tabelle 10: Ausgewählte standardisierte Ergebnisse der Knochendichtemessung

	SDS Gesamtdichte distal	SDS trabekuläre Dichte distal	SDS kortikale Dichte proximal	SDS Kortikalisdicke proximal	SDS Kortikalisfläche proximal	SDS Muskelfläche
Gesamt	-0,6 ± 3,1 (n=22)	1,0 ± 1,7 (n=22)	- 0,1 ± 0,9 (n=19)	- 0,4 ± 0,7 (n=19)	0,7 ± 1,1 (n=19)	0,3 ± 1,0 (n=19)
Gruppe 1	-0,7 ± 3,7 (n=15)	0,9 ± 1,6 (n=15)	- 0,1 ± 0,9 (n=12)	- 0,4 ± 0,8 (n=12)	0,9 ± 1,2 (n=12)	0,3 ± 1,1 (n=12)
Gruppe 2	-0,2 ± 1,0 (n=7)	1,2 ± 1,9 (n=7)	- 0,3 ± 0,9 (n=7)	- 0,5 ± 0,6 (n=7)	0,3 ± 0,9 (n=7)	0,2 ± 1,0 (n=7)

4.4.3 Knochenalter

Ein Röntgenbild der linken Hand wurde nur bei Patienten angefertigt, bei denen eine entsprechende Indikation vorlag. Diese Indikation war bei beginnender Pubertät und Grosswuchs mit einem *Standard Deviation Score* der Höhe von über zwei gegeben, sowie bei Patienten in der Wachstumsphase, bei denen noch nie eine Knochenalterbestimmung durchgeführt worden war und bei vorbekannter Knochenalterakzeleration. In drei Fällen, bei den Patienten 8, 11

und 13, wurde eine Knochenalterbestimmung zur Prognose der Endlänge auf Wunsch durchgeführt.

Tabelle 11: Knochenalterakzeleration

	Verhältnis BA/CA	Differenz BA-CA (a)	SDS prognostische Endlänge
Gesamt (n=9)	1,13 ± 0,08	1,25 ± 0,75	0,0 ± 0,8
Gruppe 1 (n=7)	1,13 ± 0,08	1,33 ± 0,83	0,1 ± 0,8
Gruppe 2 (n=2)	1,11 ± 0,02	0,95 ± 0,83	-0,5 ± 0,2

Aus Tabelle 11 ist ersichtlich, dass der Knochenaltervorsprung insgesamt mehr als ein Jahr betrug, in Gruppe 2 weniger. Weiterhin ist aber zu sehen, das die prognostische Endlänge nicht vom erwarteten Wert abweicht, sodass davon auszugehen ist, dass der Knochenaltervorsprung durch einen ebenfalls vorhandenen Wachstumsvorsprung ausgeglichen wird.

4.5 Labor

4.5.1 Allgemeines Labor

Keiner der Patienten wies Blutbildveränderungen auf. Auch die Elektrolyte, Gesamteiweiss und Albumin, Nierenretentionsparameter und Leberenzyme lagen sämtlich im Normbereich, ebenso TSH und fT4.

4.5.2 Stoffwechselparameter

Das HbA_1c lag im Durchschnitt bei 5,1 ± 0,3 % und unterschied sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Der höchste gemessene Wert war 5,6 %, d. h. alle Patienten hatten normale HbA_1c-Werte.

Tabelle 12: Stoffwechselparameter

	Gesamtcholesterin (mg/dl)	Glucose/Insulin-Ratio (mg/dl : µE/ml)	Leptin (ng/ml)
Gesamt	179 ± 30 (n=27)	6,6 ± 3,5 (n=23)	9,1 ± 6,8 (n=25)
Gruppe 1	181 ± 34 (n=19)	6,8 ± 4,0 (n=16)	7,9 ± 5,7 (n=16)
Gruppe 2	174 ± 16 (n=8)	6,2 ± 1,8 (n=7)	11,1 ± 8,1 (n=9)

Der Gesamtcholesterin-Spiegel lag bei sechs Patienten der Gruppe 1 über 200 mg/dl, da aber eine völlige Nüchternheit nicht gewährleistet war, sind diese Spiegel nicht aussagekräftig. Im Durchschnitt war der Gesamtcholesterin-Spiegel der beiden Gruppen vergleichbar.

Die Glucose/Insulin-Ratio lag insgesamt bei sieben von 23 Patienten (30%) unter dem Grenzwert von 4,5 mg/dl : µE/ml, davon fünf von 16 der Gruppe 1 (31%), zwei von sieben der Gruppe 2 (29%), das heisst die beiden Gruppen waren diesbezüglich vergleichbar.
Es bestand keine Korrelation zwischen der Glucose/Insulin-Ratio und dem DHAS-Spiegel, wie sie von *Legro et al.* bei Frauen mit PCOS gefunden worden war. (48)

Abbildung 7: fehlende Korrelation zwischen Glucose/Insulin-Ratio und DHAS-Spiegel

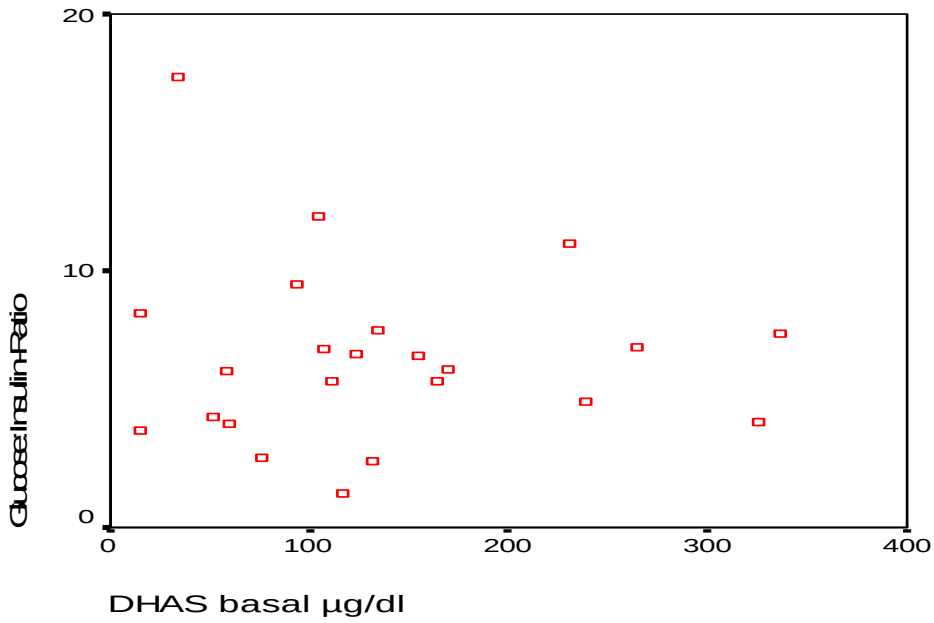
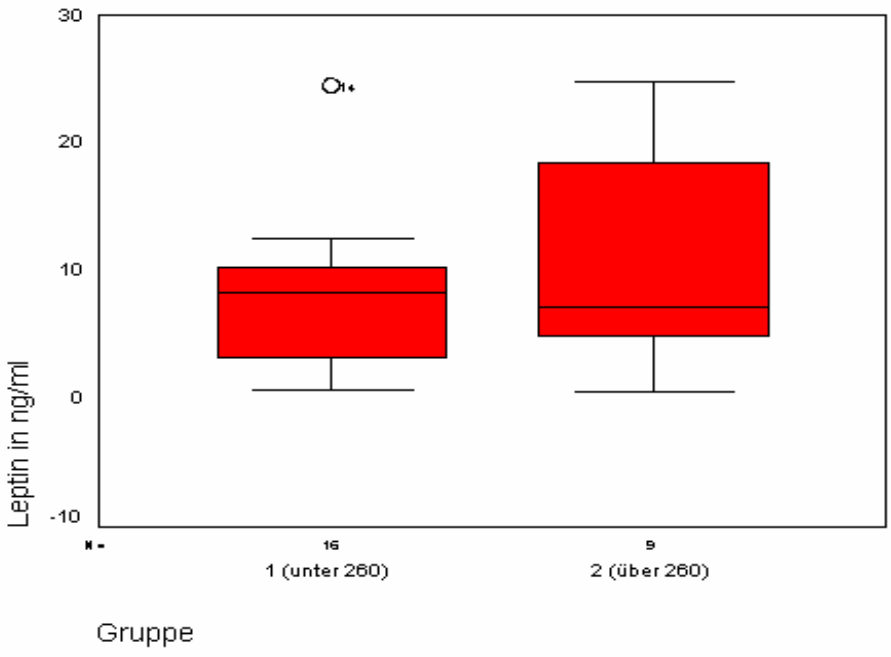


Abbildung 8: Verteilung der Leptinwerte beider Gruppen



Ein Unterschied der Leptin-Spiegel zwischen den beiden Gruppen ist aus der Tabelle 12 und aus Abbildung 8 ersichtlich. Dieser errreicht allerdings keine statistische Signifikanz (Z= 0,510, p= 0,610).

Abbildung 9: Korrelation des Leptin-Spiegels mit dem BMI

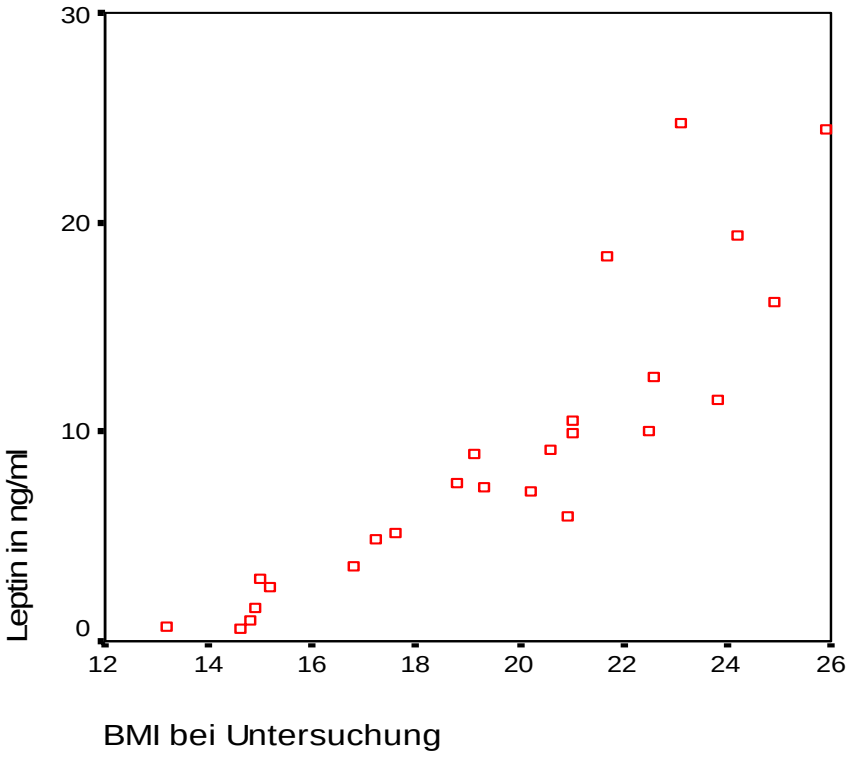
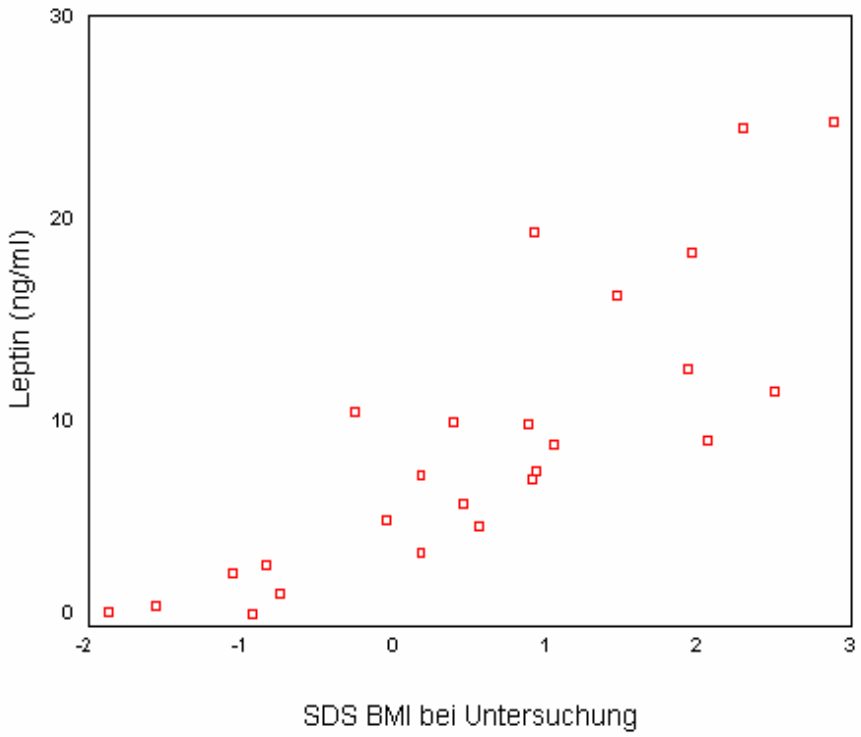
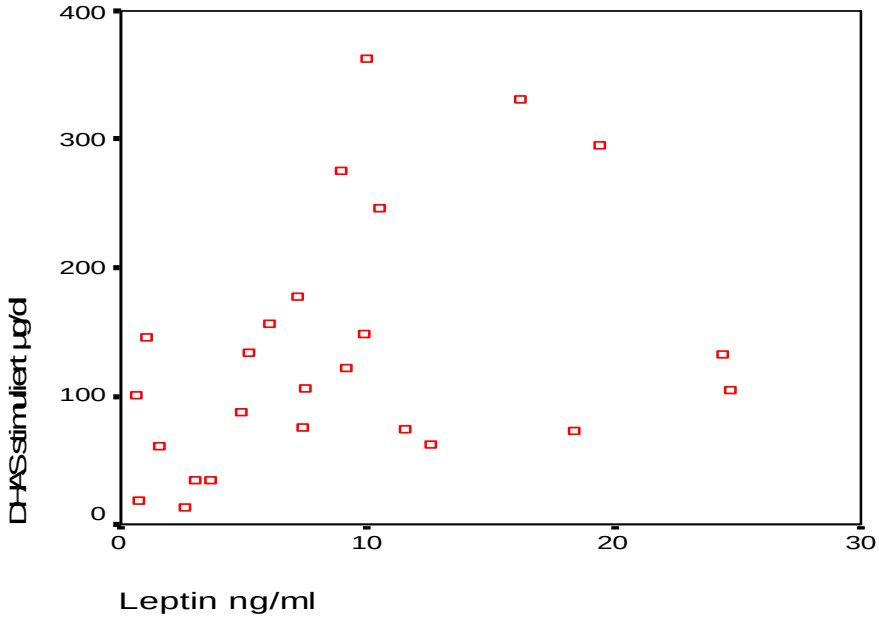


Abbildung 10: Korrelation des Leptin-Spiegels mit dem SDS-BMI



Der Leptin-Spiegel korrelierte insgesamt erwartungsgemäss mit dem BMI (r=0,958, p < 0,01), (Abbildung 9). Allerdings war eine noch stärker signifikante Korrelation des Leptin-Spiegels mit dem SDS-BMI nachzuweisen (r= 0,844, p < 0,001) (Abbildung 10).

Abbildung 11: Korrelation des DHAS- Spiegels mit dem Leptin im Serum



Auch zwischen dem Leptin-Spiegel und dem DHAS-Spiegel nach ACTH-Stimulation bestand eine signifikante Korrelation ($r = 0{,}424$, $p < 0{,}05$).

4.5.3 ACTH-Test

Die *Pediatric Steroid Profiles* unterscheiden Kinder im präpubertären Alter von zwei bis neun Jahren und Jugendliche im pubertären Alter von zehn bis 18 Jahren.
Zwölf von 28 (43 %) unserer Patienten waren unter zehn Jahre alt und fielen daher in die präpubertäre Altersklasse, acht von 19 (42 %) in der Gruppe 1, vier von neun (44 %) in der Gruppe 2.

Tabelle 13, Teil 1: Referenzdaten der basalen und stimulierten Hormonwerte

	DHAS (µg/dl) basal	DHAS (µg/dl) stimuliert [a]	Testosteron (ng/dl) basal	Testosteron (ng/dl) stimuliert [a]	Andro-stendion (ng/dl) basal	Andro-stendion (ng/dl) stimuliert
präpubertär Mittelwert (Streubreite)	25 (5-115)	31 (5-120)	5 (3-9)	9 (3-15)	32 (5-51)	64 (30-144)
pubertär Mittelwert Streubreite	128 (32-305)	139 (33-310)	82 (5-310)	89 (5-294)	82 (3-149)	141 (84-257)

[a] DHAS und Testosteron reagieren normalerweise nicht im ACTH-Test

Tabelle 13, Teil 2: Referenzdaten der basalen und stimulierten Hormonwerte

	Δ Andro-stendion (ng/dl)	Cortisol (µg/dl) basal	Cortisol (µg/dl) stimuliert	17-OHP (ng/dl) basal	17-OHP (ng/dl) stimuliert	Δ 17-OHP (ng/dl)
präpubertär Mittelwert Streubreite	33 (5-111)	13 (7-20)	29 (22-41)	46 (10-110)	185 (83-280)	139 (30-240)
Pubertär Mittelwert Streubreite	59 (9-130)	10 (5-19)	24 (15-33)	58 (14-169)	154 (88-292)	96 (37-216)

Tabelle 14, Teil 1: Basale und stimulierte Hormonwerte [a] der Patienten in Mittelwert und Standardabweichung (Streubreite)

	DHAS (µg/dl) basal	DHAS (µg/dl) stimuliert	Androstendion (ng/dl) basal	Androstendion (ng/dl) stimuliert	Δ Androstendion (ng/dl)
Gesamt präpubertär (n= 12)	74 ± 31 (15-116)	72 ± 31 (19-122)	57 ± 20 (29-88)	98 ± 36 (34-179)	41 ± 31 (0-119)
Gesamt pubertär (n= 16)	175 ± 94 (15-336)	180 ± 102 (13-336)	155 ± 80 (44-320)	188 ± 90 (80-399)	34 ± 31 (-30-95)
Gruppe 1 präpubertär (n=8)	62 ± 31 (15-116)	62 ± 33 (19-122)	58 ± 21 (32-88)	85 ± 26 (34-124)	26 ± 18 (0-54)
Gruppe 1 pubertär (n=11)	174 ± 86 (43-336)	174 ± 96 (45-363)	157 ± 82 (85-320)	192 ± 95 (104-399)	35 ± 23 (8-79)
Gruppe 2 präpubertär (n=4)	98 ± 15 (78-111)	91± 14 (73-104)	56± 20 (29-76)	125 ± 43 (74-179)	68± 34 (45-119)
Gruppe 2 pubertär (n=5)	177 ± 122 (15-325)	194 ± 126 (13-331)	149 ± 86 (44-271)	180 ± 86 (80-287)	31 ± 49 (-30 - 95)

Tabelle 14, Teil 2: Basale und stimulierte Hormonwerte

	Cortisol (µg/dl) basal	Cortisol (µg/dl) stimuliert	17-OHP (ng/dl) basal	17-OHP (ng/dl) stimuliert	Δ 17-OHP (ng/dl)
Gesamt präpubertär (n=12)	10,6 ± 5,0 (2,6-20.0)	40,2 ± 2,9 (36,05-45,2)	88 ± 56 (39-235)	388 ± 170 (185-791)	300 ± 173 (137-738)
Gesamt pubertär (n= 16)	12,1 ± 4,2 (5,7-18,99)	36,7 ± 6,5 (27,3-49,8)	125 ± 84 (54-409)	341 ± 169 (169-712)	216 ± 147 (80-658)
Gruppe 1 präpubertär (n=8)	12,2 ± 5,0 (4,2 –20)	39,2 ± 2,2 (36,1-42,2)	102 ± 64 (39-235)	305 ± 92 (185-464)	203 ± 37 (137-254)
Gruppe 1 pubertär (n=11)	13,2 ± 4,1 (7,3-19,0)	36,4 ± 7,4 (27,3-49,8)	102 ± 28 (58-157)	244 ± 61 (169-334)	143 ± 56 (80-232)
Gruppe 2 präpubertär (n=4)	7,2 ± 3,5 (2,6-10,0)	42,3 ± 3,3 (38,2-45,2)	59 ± 17 (41-81)	553 ± 177 (396-791)	494 ± 176 (335-738)
Gruppe 2 pubertär (n=5)	9,8 ± 3,9 (5,7-14,5)	37,3 ± 4,5 (34,4-45,1)	178 ± 139 (54-409)	553 ± 128 (438-712)	375 ± 164 (263-658)

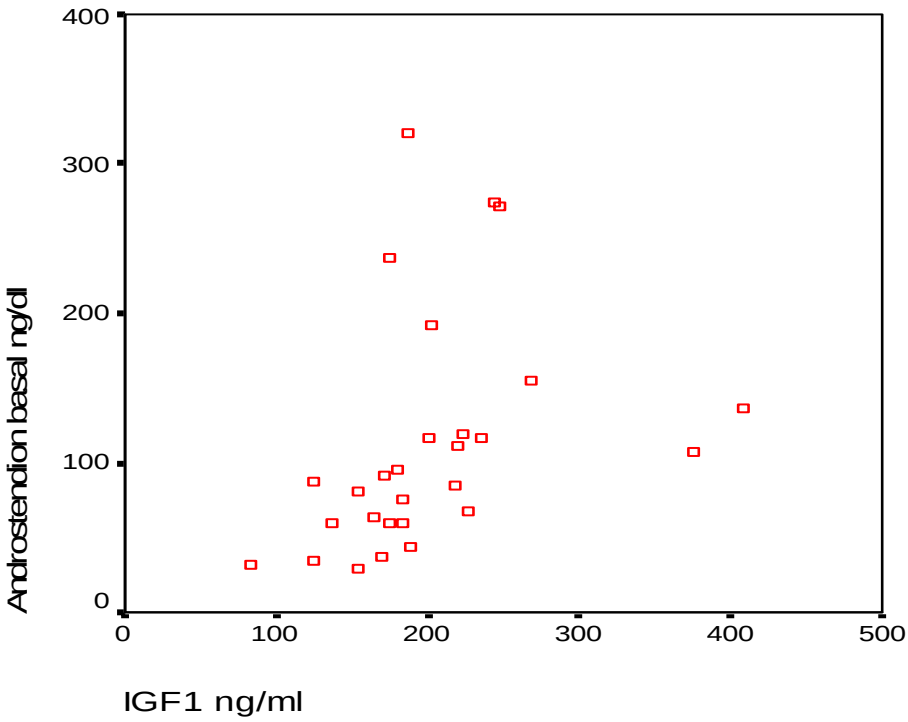
[a] Da die Nachweisgrenze unserer Testosteronbestimmung bei 15 ng/dl liegt, die präpubertären Grenzwerte aber darunter liegen, war hier die Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen nicht möglich.

Das basale und stimulierte DHAS war bei zwei Patientinnen der Gruppe 1 (11%) über die normale Streubreite hinaus erhöht, bei den Patientinnen Nr. 10 und 16. Bei der Patientin Nr. 16 lagen die Werte mit 116 und 122 µg/dl nur 1 bzw. 2 µl über den Normgrenzen. Bei der Patientin Nr. 10 dagegen waren die Werte mit 336 und 363 µg/dl deutlich erhöht.
In der Gruppe 2 waren bei einer Patientin (11%), derjenigen mit der Nr. 20, ähnlich hohe basale (325 µg/dl) und stimulierte (331µg/dl) DHAS-Spiegel gemessen worden.

Die Testosteronwerte lagen bei drei präpubertären Patienten 2-7 ng/dl über der Normgrenze von 9 bzw. 15 ng/dl, was keine klinische Relevanz hat.

Die basalen Androstendion-Spiegel waren bei insgesamt 14 von 28 Patienten (50%) erhöht, in der Gruppe 1 bei neun von 19 (47%), in der Gruppe 2 bei fünf von neun Patienten (56%). Es bestand hierin also kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.
Die stimulierten Androstendionwerte waren nur bei zwei Patienten in jeder Gruppe über die Normgrenze erhöht, d.h. bei 11% der Gruppe 1 und bei 22% der Gruppe 2. Alle diese Patienten hatten bereits basal erhöhte Androstendionwerte.
Zwischen den basalen Androstendion-Spiegeln und den IGF-1-Werten ergab sich eine signifikante Korrelation ($p<0,01$, $r = 0,665$), dargestellt in Abbildung 12, ebenso zwischen dem stimulierten Androstendion-Spiegel und dem IGF-1 ($p<0,01$, $r = 0,579$), was eine ähnliche Grafik wie Abbildung 12 ergibt und deswegen nicht dargestellt ist.
Der stimulierte Androstendion-Spiegel korrelierte zusätzlich schwach signifikant mit dem BMI ($p<0,05$, $r = 0,399$).

Abbildung 12: Korrelation zwischen den basalen Androstendion-Spiegeln und den IGF-1-Werten



Drei Patienten, einer in Gruppe 1 (Nr. 13, männlich) und zwei in Gruppe 2 (Nr. 25, weiblich und Nr. 29, männlich) hatten erniedrigte basale Cortisol-Spiegel.

Der einzige signifikante Unterschied der Hormonwerte der beiden Gruppen, abgesehen von den gruppendefinierenden 17-OHP-Werten, bestand in signifikant niedrigeren basalen Cortisol-Spiegeln in der Gruppe 2 ($Z=-2{,}287$, $p<0{,}05$).

Nach Stimulation lag der Cortisol-Spiegel bei insgesamt 10 Patienten über der Normgrenze, was keine Bedeutung hat. Bei allen Patienten stieg das Cortisol nach Stimulation adäquat an.

Das basale 17-OHP war nur bei drei Patienten der Gruppe 1 (16%) und bei zwei der Gruppe 2 (22%) erhöht. Das 17-OHP nach ACTH-Stimulation lag bereits bei 7 Patienten der Gruppe 1 (37%) ausserhalb des Normbereichs, aufgrund unserer Gruppeneinteilung natürlich bei allen in der Gruppe 2. Das Δ-17-OHP lag aber nur im Grenzbereich der Gruppen, bei der Patientin Nr. 19, ausserhalb des Referenzbereichs der *Pediatric Steroid Profiles.*

Dieser Referenzbereich stimmt also mit dem von *Knorr et. al* aus dem Jahre 1986 weitgehend überein.

Aus den folgenden drei Abbildungen (13, 14 und 15) ist ersichtich, dass sich die beiden Gruppen im basalen 17-OHP-Spiegel nicht unterscheiden, erst nach ACTH-Stimulation sind die Unterschiede erkennbar.

Abbildung 13: 17-OHP basal

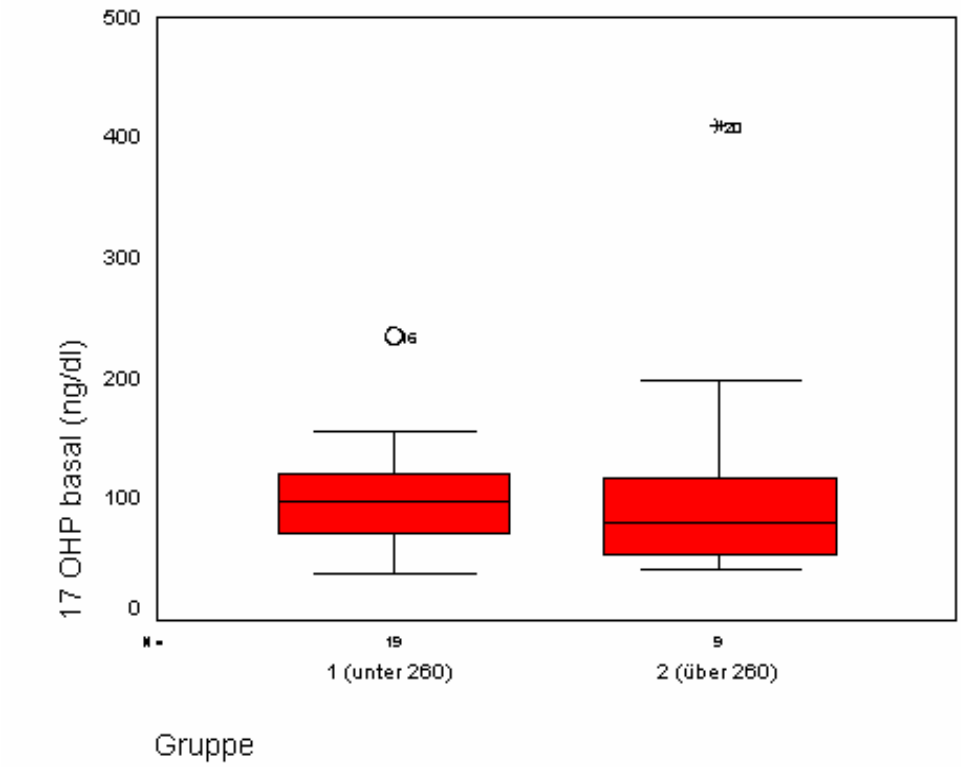


Abbildung 14: 17-OHP 60 min. nach ACTH-Stimulation

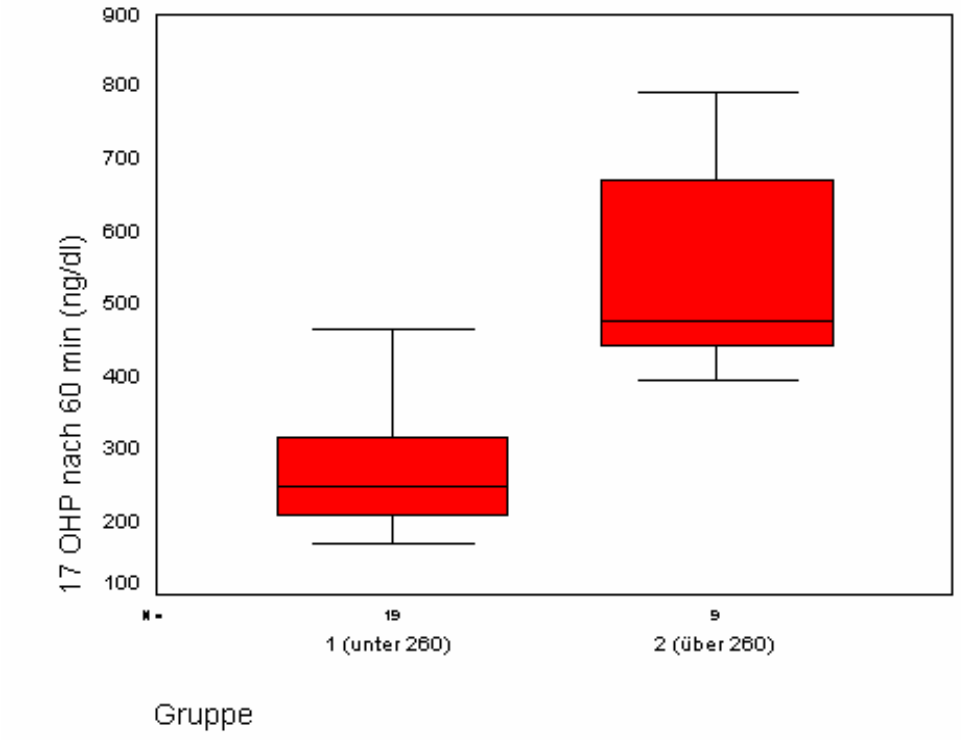
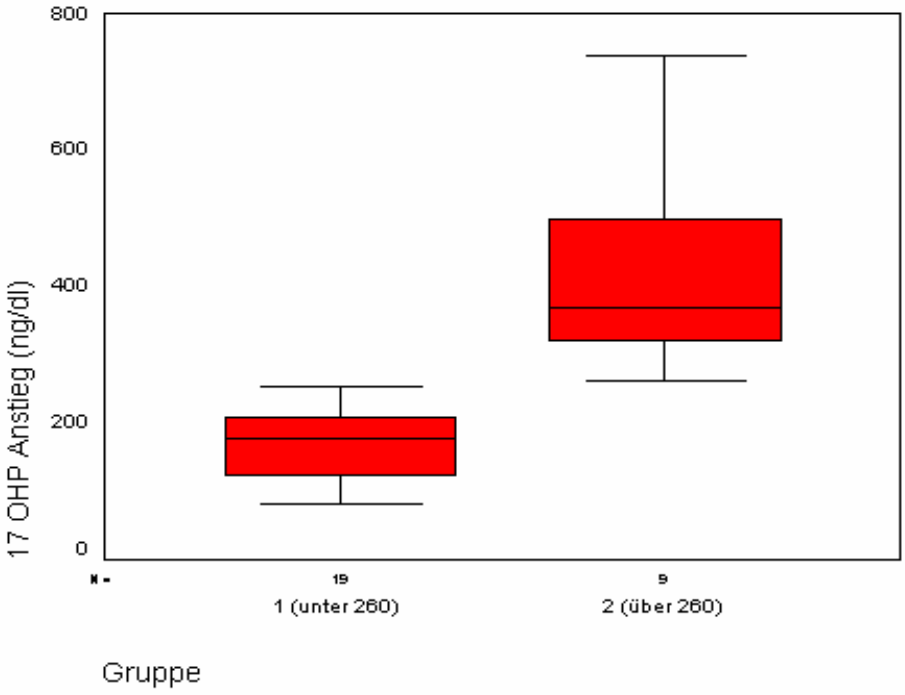


Abbildung 15: 17-OHP Anstieg (Einteilung der beiden Gruppen)

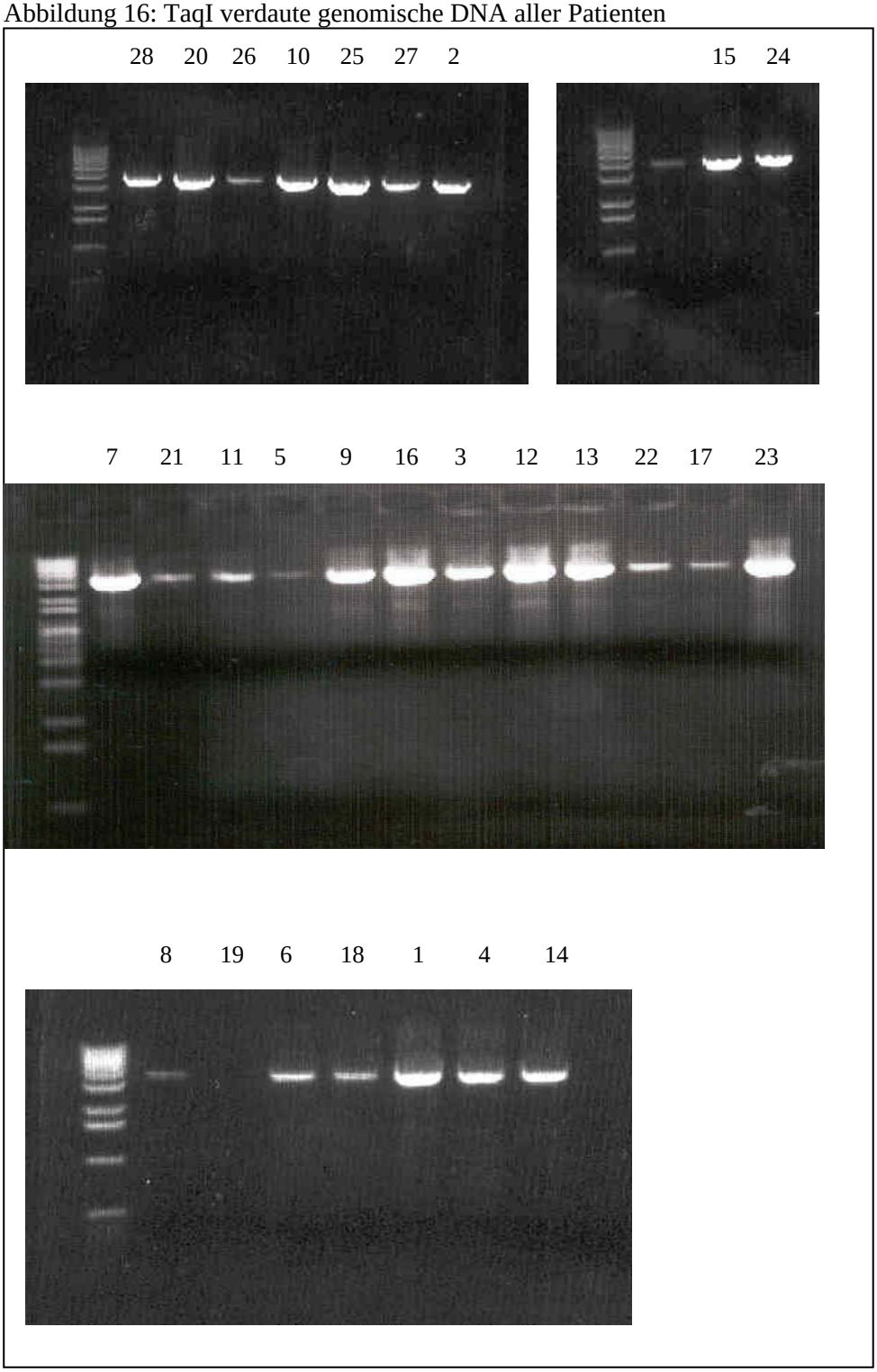


4.6 Ergebnisse der DNA-Analyse

4.6.1 DNA-Extraktion

In der Abbildung 16 sind sämtliche Gelläufe gezeigt, die den quantitativen TaqI-Verdau der extrahierten und gereinigten genomischen DNA darstellen. Über den Gelen sind die Patientennummern angegeben. Es ist zu sehen, dass bei einer Patientin, Nr. 19, keine DNA extrahiert wurde, auch in der Konzentrationsmessung konnte leider nur Verunreinigung festgestellt werden. Bei allen anderen Patienten ist die 3,7 kb-Bande dargestellt, die das CYP21-Gen nachweist.

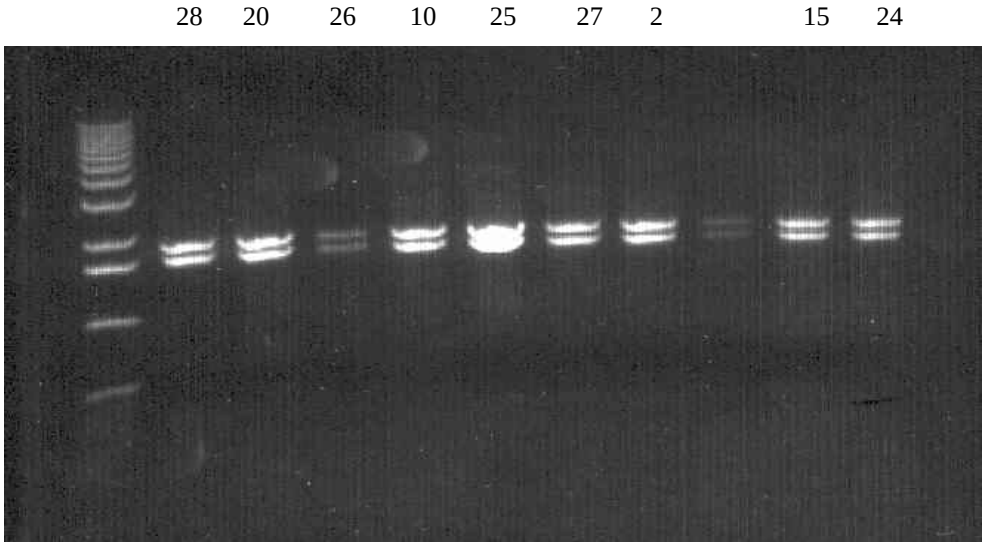
Abbildung 16: TaqI verdaute genomische DNA aller Patienten



4.6.2 Amplifikation des CYP21-Gens

In der folgenden Abbildung 17 ist exemplarisch der EcoRI-Kontrollverdau des PCR-Produkts einiger Patienten gezeigt. Bei 27 Patienten gelang die Amplifikation des CYP21-Gens.

Abbildung 17: Nachweis des amplifizierten CYP21-Gens im EcoRI-Verdau



4.6.3 Sequenzierung des CYP21-Gens

Bei allen Patienten der Gruppe 2 wurde eine Cycle-Sequenzierung des CYP21-Gens durchgeführt. Es wurde nach den hierzulande zehn häufigsten Mutationen im CYP21-Gen (42) gesucht.

Tabelle 15: die zehn häufigsten Mutationen im CYP21-Gen

Exon/Intron	Position	Mutation
Ex 1	bp 0089	P30L
In 2	bp 0655	splice site: A od C→G
Ex 3	bp 0708-0715	8 bp Deletion
Ex 4	bp 0999	I172N
Ex 6 Ex 6 Ex 6	bp 1382 bp 1385 bp 1391	V236E I237N Cluster M239K
Ex 7	bp 1686	V281L
Ex 7	bp 1763	F306 +T
Ex 8	bp 1998	Q 318 Stop
Ex 8	bp 2112	R386W
Ex 10	bp 2583	P453S

Bei keinem der 9 Patienten konnte eine der aufgeführten Mutationen gefunden werden.

4.6.4 RFLP-Darstellung und Oligonukleotid-Hybridisierung

Die Untersuchung auf grosse Deletionen und Genkonversionen mit der RFLP-Analyse mittels Southern Blots wurde bei 27 Patienten durchgeführt. Es wurden bei keinem der Patienten eine Auffälligkeit der CYP21-Allele gefunden.

Bei der Oligonukleotidhybridisierung zur Suche nach den oben genannten häufigsten Punktmutationen wurde unter 27 Patienten bei einer Patientin, Nr. 7, eine Punktmutation gefunden. Es handelt sich um die Deletion des Basenpaares 1998, die zu einem Stopcodon führt, das heisst um die Mutation Q318 Stop. Diese Mutation ist mit insgesamt 4,8% die fünfthäufigste Mutation bei Patienten mit AGS. Sie tritt bei 7,6% der Patienten mit salzverlierendem AGS und bei 1% mit einfach virilisierendem AGS auf, bei nichtklassischem AGS ist sie nicht typisch. (41)

5 Diskussion

5.1 Bestimmung der Heterozygotenhäufigkeit

Nach den Daten von *Knorr et al*. (39), die zur Definition der Heterozygotenhäufigkeit in unserer Abteilung bislang herangezogen wurden, galten von unseren 28 Patienten neun, das sind 32%, als heterozygote Carrier einer Mutation im CYP21-Gen. Diese Anzahl liegt innerhalb der Streubreite der Häufigkeiten, die in bisherigen Studien mit ACTH-Tests an Patienten mit Prämaturer Pubarche gefunden wurde, so hatten z. B. *Knorr et al*. 41% Heterozygote gefunden.

In der molekularbiologischen Untersuchung des CYP21-Gens von 27 Patienten haben wir allerdings nur eine heterozygote Mutation gefunden, bei einer Patientin, die im ACTH-Test einen 17-OHP-Anstieg von lediglich 137 ng/dl hatte.

Die Heterozygotenhäufigkeit beträgt in München wie gesagt ungefähr 1:37 (26). Dass in der vorliegenden Untersuchung ein Patient von 27 mit einer Heterozygotie gefunden wurde, ist somit als im Rahmen der allgemeinen Häufigkeit zu betrachten.

Unsere Studie lässt daher die Schlussfolgerung zu, dass ein heterozygoter 21-Hydroxylase-Mangel keine häufige Ursache für Prämature Pubarche ist, sondern dass bei Patienten mit typischer Prämaturer Pubarche eine Heterozygotie für CYP21-Mutationen nicht häufiger als in der Allgemeinbevölkerung vorkommt.

Eine von anderen Autoren bereits angenommene, ursächlich aber bislang ungeklärte enzymatische Dysregulation des P450c17 mit 17α-Hydroxylase- und 17,20-Lyase-Aktivität käme daher als alternative Grundlage der Prämaturen Pubarche in Frage. Sie könnte sowohl die 17-OHP-Erhöhung, als auch das bei 50% der Patienten erhöhte Androstendion erklären. Warum allerdings nur einige Patienten mit Prämaturer Pubarche erhöhte Androstendionwerte und eine pathologische 17-OHP-Antwort im ACTH-Test aufweisen und die Frage, ob die Pathogenese bei diesen und den Patienten mit normalen Hormon-Spiegeln die gleiche ist, bleibt Gegenstand der Forschung.

5.2 Bedeutung des ACTH-Tests bei Prämaturer Pubarche

In unserer Studie hat sich überhaupt keine Korrelation zwischen dem Ergebnis des ACTH-Tests und der Mutationsanalyse des CYP21-Gens ergeben. Lediglich eine Patientin aus der Gruppe 1, die also nach dem Ergebnis des ACTH-Tests als nicht-heterozygot eingestuft worden war, hatte eine in der Oligonukleotidhybridisierung nachweisbare Mutation. Der ACTH-

Test hatte also sowohl ein falsch negatives Ergebnis als auch neun falsch positive Ergebnisse geliefert. Er ist daher zur Diagnose der Heterozygotie für AGS bei Patienten mit typischer Prämaturer Pubarche nicht geeignet. Sollte also zum Beispiel eine genetische Beratung bei einem bekannten AGS-Fall in der Familie des anderen Partners erwünscht sein, ist eine molekulargenetische Diagnostik zwingend notwendig. (31)

Wie aber bereits von anderen Untersuchern festgestellt wurde, muss dagegen bei Vorliegen einer atypischen Prämaturen Pubarche z.B. mit Klitorisvergrösserung, aber auch bei einem um mehr als zwei Standardabweichungen fortgeschrittenen Knochenalter, mit einem ACTH-Test ein homozygoter 21-Hydroxylase-Mangel, besonders eine nicht-klassische oder Late-onset-Form, ausgeschlossen werden. (8) Denn die basalen Hormonwerte können bei diesen Patienten im Normbereich liegen. (31, 54) Dies ist besonders im Hinblick auf eine genetische Beratung wichtig, da sich im Allgemeinen bei ausreichender Restaktivität der 21-Hydroxylase keine therapeuthische Konsequenz ergibt.

Aber auch die oben erwähnte Dysregulation des P450c17-Enzyms kann zu einer pathologischen 17-OHP-Antwort auf ACTH führen. *Lucky et al.* hatten bei Patientinnen mit Akne und Hirsutismus deswegen bei durchschnittlich 58% eine adrenale Komponente vermutet.

Diese funktionell veränderte Enzymaktivität betrifft aber sowohl die Nebenniere als auch die Ovarien. *(*49)

Ibanez et al. hatten bei 45% der postpubertären Mädchen nach Prämaturer Pubarche einen funktionellen ovariellen Hyperandrogenismus (FOH) gefunden. Sie empfehlen deswegen neben einem ACTH-Test zur Evaluation eines möglichen Defekts der 21-Hydroxylase oder der 3ß-HSD die Durchführung eines Stimulationstests mit einem GnRH-Agonisten, z.B. Leuprolidacetat, besonders bei Mädchen mit Oligomenorrhoe und Hirsutismus, um auch die ovarielle Funktion zu überprüfen. Eine erhöhte Aktivität der 17α-Hydroxylase und 17,20-Lyase aufgrund einer Dysregulation des CYP17 scheint in der überwiegenden Zahl der Fälle für die erhöhten poststimulatorischen 17-OHP-Werte und auch die erhöhten basalen Androstendion- und Testosteron-Werte verantwortlich zu sein (Vergleiche Abbildung 1). Dieses Enzym wird sowohl in der Nebenniere als auch in den Ovarien durch dasselbe Gen codiert. Eine erhöhte adrenale Androgenproduktion während der Adrenarche mit der klinischen Konsequenz der Prämaturen Pubarche und einer späteren ovariellen Überproduktion an Androgenen mit der Folge des FOH ist daher naheliegend. Allerdings konnte bis jetzt kein Parameter identifiziert werden, mit dem eine solche Entwicklung vorausgesagt oder für unwahrscheinlich erklärt werden kann.

Eine Sonographie der Ovarien zur Erkennung eines PCOS ist deshalb bei allem Mädchen nach Prämaturer Pubarche anzuraten. Allerdings ist der abdominelle Ultraschall mit einer hohen falsch negativen Rate behaftet, ein transvaginaler Schall ist hier wesentlich ausagekräftiger, bei den zumeist virginen Patientinnen aber nicht zumutbar. (32)

5.3 Vergleich der beiden Gruppen mit normalem und abnormem 17-OHP-Anstieg

Die Patienten unserer Studie waren anhand des ACTH-Tests in zwei Gruppen eingeteilt worden: Gruppe 1 umfasst 19 Patienten mit normalem 17-OHP-Anstieg, Gruppe 2 neun Patienten mit überhöhtem 17-OHP-Anstieg nach ACTH-Stimulation. Wir haben einen Vergleich aller gemessenen Daten zwischen den beiden Gruppen durchgeführt um herauszufinden, ob der 17-OHP-Anstieg ein prognostischer Faktor im Bezug auf Begleit- und Folgeerscheinungen des Androgenexzesses ist, d. h. ob ein ACTH-Test bei Patienten mit Prämaturer Pubarche durchzuführen sei, um Patienten mit erhöhtem Risko für Folgeerkrankungen frühzeitig herauszufiltern und engmaschig zu kontrollieren.

5.3.1 Auxologische Daten

Bereits bei Erstdiagnose waren die Patienten der Gruppe 2 mit – 0,08 $\pm$ 1,17 SDS durchschnittlich kleiner als die Patienten der Gruppe 2 mit 0,74 $\pm$ 1,01 SDS. Der Unterschied war aber noch nicht signifikant. Bis zum Untersuchungszeitpunkt hatte sich der Unterschied bis zur Signifikanz vergrössert: die Patienten der Gruppe 2 waren jetzt mit - 0,17 $\pm$ 1,20 SDS signifikant kleiner als die Patienten der Gruppe 1 mit 1,15 $\pm$ 0,92 SDS ($Z=2{,}830$, $p=0{,}005$) (Abbildung 5). Es ist daher anzunehmen, dass nicht der Hyperandrogenismus an sich, der ja in der Gruppe 2 ausgeprägter war, zu einem Wachstumsvorsprung führt, sondern dass andere Faktoren, hier käme z. B. IGF-1 in Frage, auslösend sind.

5.3.2 Androgene und ihre Effekte

5.3.2.1 Schweissgeruch und Axillarbehaarung

Bei Diagnosestellung unterschieden sich die beiden Gruppen nicht im Hinblick auf die Häufigkeit von festgestelltem adultem Schweissgeruch. Hierzu muss allerdings bemerkt werden, dass die Feststellung dieses Merkmals natürlich untersucherabhängig ist und ausserdem bei Verwendung von Deodorant gezielt danach gefragt werden muss.

Dagegen ist die Axillarbehaarung ausreichend objektivierbar. Diese war bei Diagnosestellung bei Patienten der Gruppe 2 signifikant häufiger, mehr als dreimal so oft, begleitend festzustel-

len gewesen. Da angenommen werden kann, dass bei den Patienten, die im ACTH-Test einen abnorm hohen 17-OHP-Anstieg zeigten, bereits bei Auftreten der Pubarche höhere Spitzen der 17-OHP-Spiegel erreicht wurden, liegt ein direkter Einfluss der 17-OHP-Spiegel auf die Ausprägung von Axillarbehaarung zusätzlich zur Pubesbehaarung nahe.
Zum Untersuchungszeitpunkt bestanden bezüglich der klinisch evaluierten Zeichen des Androgeneinflusses in Form der Pubesbehaarung, der Axillarbehaarung, des adulten Schweissgeruches, der Körperbehaarung und vorhandener Akne keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mehr.

5.3.2.2 DHAS

In den durchschnittlichen DHAS-Spiegeln bestand zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied, d. h. dass die 17-OHP-Erhöhung in der Gruppe 2 bei reduzierter 21-Hydroxylaseaktivität im Rahmen der oben vermuteten Dysregulation des P450c17-Enzyms anscheinend zu keiner vermehrten Umwandlung von 17-OH-Pregnenolon zu DHEA führte.

5.3.2.3 Androstendion

Die basalen Androstendion-Spiegel waren bei insgesamt 14 von 28 Patienten (50%) erhöht, in der Gruppe 1 bei neun von 19 (47%), in der Gruppe 2 bei fünf von neun Patienten (56%). Es bestand hierin also kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Daher kommt dem Androstendion als Vorstufe potenter Androgene wie Testosteron in der Entwicklung eines Hyperandrogenismus wahrscheinlich eine grössere Bedeutung zu als dem DHAS, welches wie oben erwähnt kaum erhöht war. Warum allerdings bei 50% der Patienten das Androstendion nicht erhöht war und daher auch weniger klinische Zeichen des Hyperandrogenismus festzustellen waren und ob diese sich in der Pathogenese der Prämaturen Pubarche unterscheiden, bleibt ungeklärt.

5.3.3 Erhöhte diastolische Blutdruckwerte

Die Patienten der Gruppe 2 wiesen signifikant höhere SDS der diastolischen Blutdruckwerte auf, die allerdings im Rahmen von 0,77 $\pm$ 0,83 SDS noch nicht als hyperton einzustufen sind. Die Erhöhung im Vergleich zur Altersnorm ist in dem Rahmen zu sehen, in dem bereits andere Autoren ein verstärktes Risiko diskutieren, das Patienten mit Prämaturer Pubarche haben, später ein metabolisches Syndrom zu entwickeln (27, 29). Dazu gehört bekanntermassen auch die arterielle Hypertonie. Wir konnten allerdings erstmals zeigen, dass Patienten mit abnormer

17-OHP-Antwort auf ACTH-Stimulation höhere diastolische Blutdruckwerte haben und daher ein eventuell höheres Risiko einer späteren arteriellen Hypertonie.

5.3.4 Knochendichte

Die beiden Gruppen unterschieden sich in den Ergebnissen der Knochendichtemessung nicht voneinander. Allerdings zeigten sich im Vergleich zu den Normwerten gesunder Kinder einige Auffälligkeiten, die unten näher erläutert werden.

5.3.5 Leptin

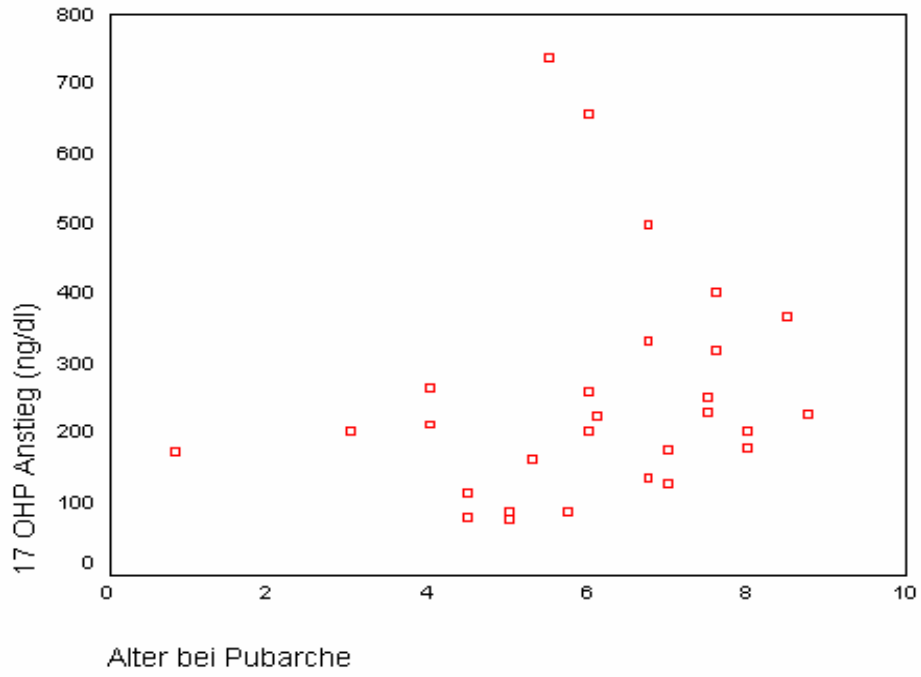
Bemerkenswert ist, dass in der Gruppe 2 eine höherer durchschnittlicher Leptin-Spiegel gemessen wurde als in der Gruppe 2, da sich die Gruppen im SDS-BMI nicht voneinander unterschieden und die Patienten der Gruppe 2 ausserdem signifikant kleiner waren. Es ist also möglich, dass das Leptin, für das in der Nebenniere bereits Rezeptoren nachgewiesen werden konnten, eine mitverursachende Rolle bei den enzymatischen Auffälligkeiten spielt (7).

5.4 Auffälligkeiten unserer Patientengruppe

5.4.1 Alter bei Pubarche

Es ergab sich eine schwach signifikante Korrelation des 17-OHP-Anstiegs mit dem Alter bei Auftreten der Pubarche ($r= 0{,}371$, $p<0{,}05$). Es kommt also wahrscheinlich bei Patienten mit pathologischer 17-OHP-Antwort auf ACTH und somit auch sonst z.B. in Stresssituationen auftretende 17-OHP-Spitzen durch eine intermittierende hormonelle Stimulation der Haarfollikel früher zur Prämaturen Pubarche.

Abbildung 18: Korrelation des 17-OHP-Anstiegs nach ACTH-Stimulation mit dem Alter der Pubarche



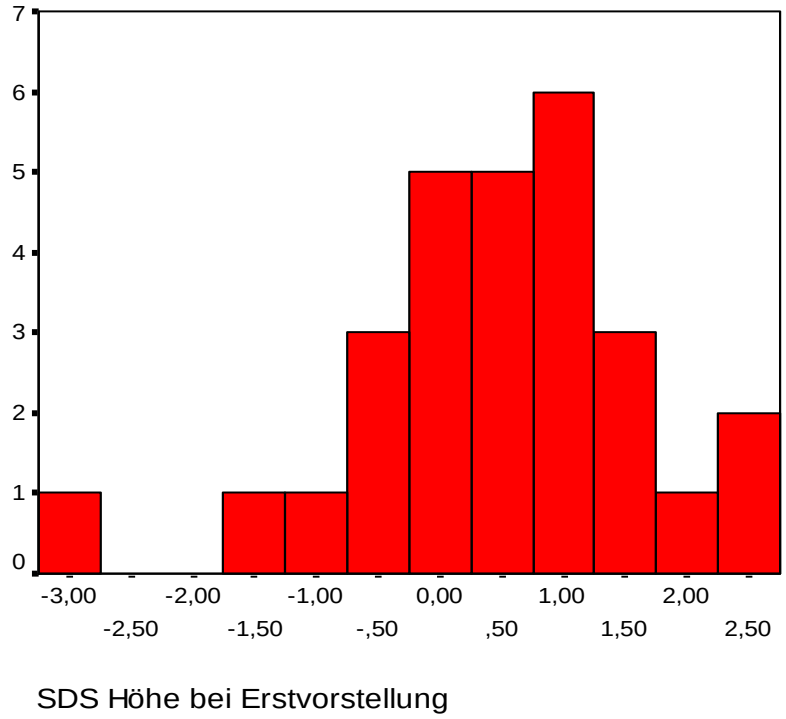
5.4.2 Geburtsgewicht

Insgesamt lag nur ein Patient von 28 unter der zehnten Perzentile und galt damit als *small for gestational age*, bei diesem handelte es sich ausserdem um einen der Zwillinge, den Patienten Nr. 6. Die in der Literatur zu findende Erniedrigung des Geburtsgewichts bei Patienten mit Prämaturer Pubarche lag bei unseren Patienten nicht vor. (72)

5.4.3 Körpergrösse

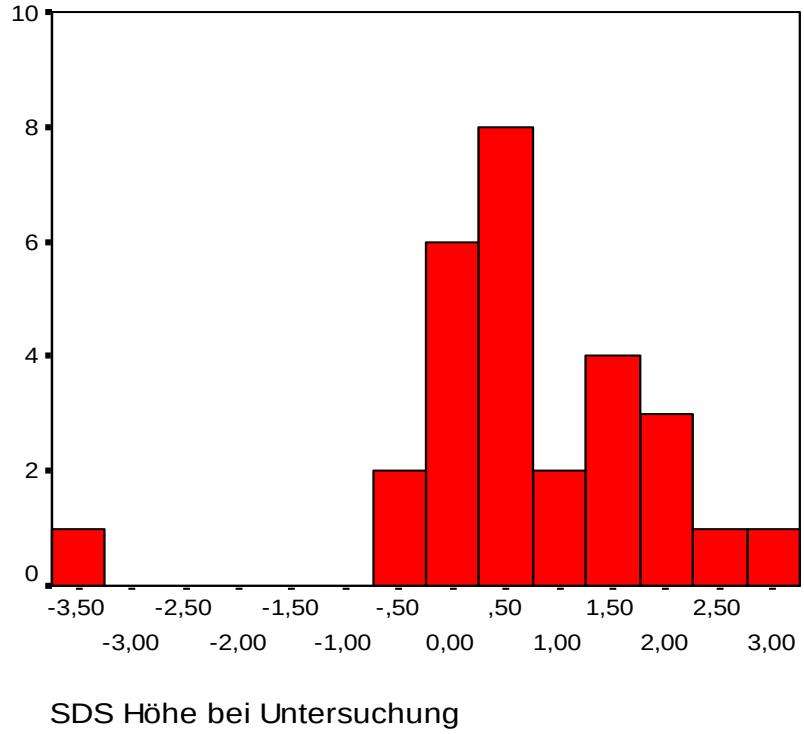
Die mittlere familiäre Zielgrösse der Patienten lag im Rahmen des Bevölkerungs-durchschnitts. Bei Erstdiagnose war, wie bei anderen Patientenkollektiven, eine signifikant überdurchschnittliche Körperhöhe von 0,47 $\pm$ 1,16 SDS unserer Patienten aufgefallen (T=2,172, df=27, p=0,039), wie aus Abbildung 19 ersichtlich.

Abbildung 19: SDS Körperhöhe aller Patienten bei Erstvorstellung



Bei Bezugnahme auf das Knochenalter anstelle des chronologischen Alters waren die Patienten allerdings mit – 0,62 + 0,98 SDS signifikant unterdurchschnittlich gross (T=-2,951, df = 20, p = 0,008). So lag auch die prognostische Endlänge etwas unter dem Bevölkerungsdurchschnitt, jedoch nur bei -0,43 +1,08 SDS, was keine Signifikanz erreicht. Zum Untersuchungszeitpunkt hatte sich der Wachstumsvorsprung weiter zu 0,73 + 1,21 SDS ausgeprägt (T=3,162, df = 27, p =0,004); siehe nachfolgende Abbildung 20.

Abbildung 20: SDS-Körperhöhe der Patienten am Untersuchungstag



Zu diesem Zeitpunkt aber lag bei den 9 Patienten, bei denen ein Knochenalter bestimmt wurde, das Mittel der SDS der Höhe bezogen auf das Knochenalter mit 0,11 + 0,82 SDS nicht ausserhalb der Norm, und auch die prognostische Endlänge lag mit 0,0 $\pm$ 0,8 SDS im Normbereich.

Unsere Ergebnisse bestätigen daher die schon 1952 von *Silverman* gemachte Beobachtung, dass trotz der bei den Patienten mit Prämaturer Pubarche beobachteten Akzeleration des Knochenalters wegen des begleitenden Wachstumsvorsprungs kein späterer Kleinwuchs zu befürchten ist. (81)

5.4.4 BMI

Vereinzelte andere Untersuchungen haben einen erhöhten SDS-BMI bei Kindern mit Prämaturer Pubarche gefunden (45). Wir konnten bei unseren Patienten weder bei Erstvorstellung noch zum Untersuchungszeitpunkt einen signifikant erhöhten SDS-BMI feststellen. Wie die Mehrzahl der bisherigen Studien konnten wir keine Assoziation von erhöhtem Körpergewicht mit der Ausbildung der Prämaturen Pubarche, geschweige denn einen ursächlichen Zusammenhang, feststellen.

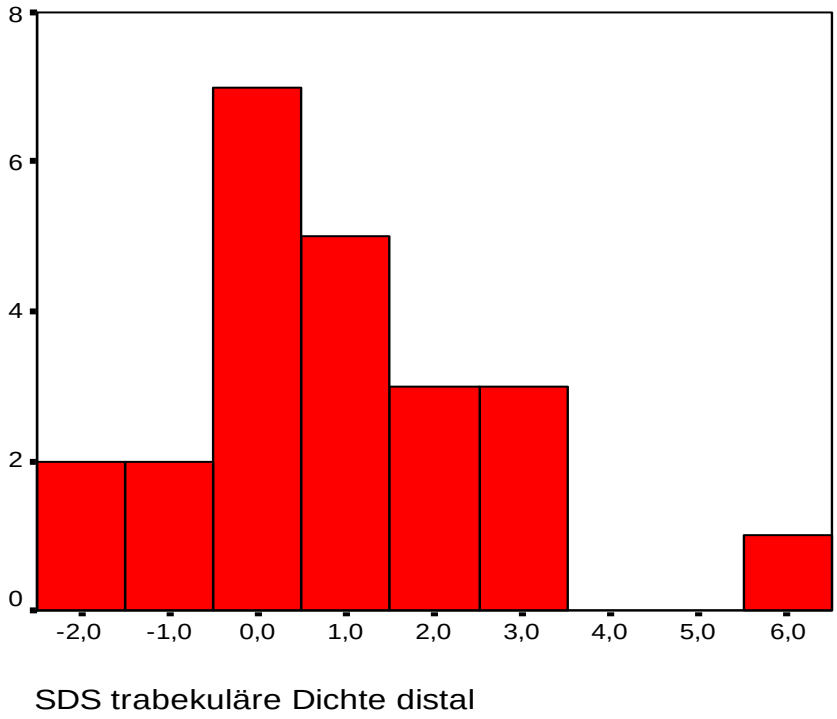
5.4.5 Knochenalter

Im Gegensatz zu anderen Studien zeigten einige unserer Patienten, bei denen eine Knochenalterbestimmung vorgenommen wurde, einen Vorsprung des biologischen Alters gegenüber dem chronologischen Alter von mehr als einem Jahr, was nicht mehr im Normbereich liegt. (71) Da dies aber nicht zu einer Beeinträchtigung der prognostischen Endlänge mit Kleinwuchs führt, ist es als passagere Erscheinung zu betrachten.

5.4.6 Knochendichte

Von *Sopher et al.* wurde 2001 die Hypothese untersucht, ob die zirkulierenden Androgene bei Patienten mit Prämaturer Pubarche einen trophischen Effekt auf die fettfreie Körpermasse hätten und so auch eine erhöhte Knochendichte verursachten. Da diese Arbeitsgruppe die Knochendichte mit DXA gemessen hatte, waren die erhobenen Werte leider nicht direkt mit unseren der pQCT-Messung vergleichbar (82). Wir fanden eine signifikant erhöhte distale trabekuläre Dichte von 0,93 $\pm$ 1,75 SDS (T = 2,565, df = 22, p = 0,018, Abbildung 21).

Abbildung 21: erhöhte trabekuläre Knochendichte



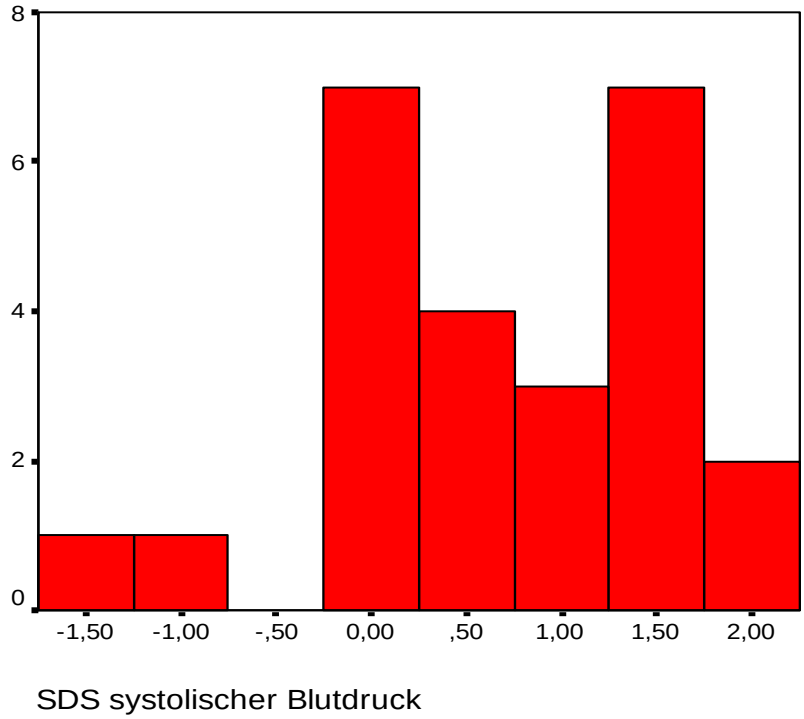
Ausserdem war bei unseren Patienten eine signifikant vergrösserte distale Gesamtquerschnittsfläche von 1,69 $\pm$ 1,57 SDS festzustellen gewesen (T = 4,311, df = 15, p = 0,001). Die anderen gemessenen Werte lagen dagegen im Normbereich, insbesondere die Muskelquer-

schnittsfläche. Dies war schon von *Sopher et al*. beobachtet worden. Unsere Arbeit bestätigt daher eine erhöhte Knochendichte bei Patienten mit Prämaturer Pubarche. (82)

5.4.7 Blutdruck

Bei unseren Patienten wurde im Durchschnitt ein signifikant erhöhter systolischer Blutdruck von 0,67 ± 0,91 SDS gemessen (T= 3,636, df = 24, p = 0,001, Abbildung 22) Die diastolischen Blutdruckwerte waren dagegen normal.

Abbildung 22: SDS der systolischen Blutdruckwerte der Patienten



Diese Einzelmessungen lassen natürlich keine direkten Rückschlüsse auf das Risiko einer Hypertonieentwicklung zu. Bisher ist noch nicht von einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie bei Kindern mit Prämaturer Pubarche berichtet worden. Da aber die Bedingungen der Studien, die die Kontrollwerte lieferten, sich nicht wesentlich von unseren Untersuchungsbedingungen unterschieden (87), ist, nach meiner Meinung, ein verstärktes Augenmerk auf den Blutdruck dieser Patienten zu richten und diese nicht-invasive Untersuchung in die Kontrolle der Patienten routinemässig miteinzubeziehen. Da andere Risikofaktoren für die Entwicklung einer Arteriosklerose bei Kindern mit Prämaturer Pubarche häufiger sind (29), spielt hier die Früherkennung aller potentieller Gefahren eine zentrale Rolle.

5.4.8 Insulinresistenz und PCOS

Insulinresistenz ist ein starker Prädiktor für Typ II Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen und ist mit Dyslipidämie, besonders Hypertriglyceridämie assoziiert. Mädchen mit Prämaturer Pubarche haben nachgewiesenermassen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz. Eine nüchtern gemessene Glucose/Insulin-Ratio unter 4,5 mg/dl : µE/ml ist stark mit einer Insulinresistenz assoziiert. (48) *Silfen et al*. fanden nur bei adipösen Patientinnen mit Prämaturer Pubarche eine Insulinresistenz. Alle Patientinnen mit normalem BMI waren in seiner Studie insulinsensitiv. (80) *Teixeira et al.* fanden bei ihrer Untersuchung an 23 Mädchen mit Prämaturer Pubarche bei 44% eine Insulinresistenz unabhängig vom BMI (88).
Auch bei unserer Untersuchung waren die Patienten mit erniedrigter Glucose/Insulin-Ratio nicht übergewichtig. Das kann bedeuten, dass auch bei normalem Körpergewicht Kinder nach Prämaturer Pubarche häufiger eine Insulinresistenz zeigen, die wiederum andere Erkrankungen, neben der Entwicklung eines Typ II Diabetes im späteren Lebensalter unter anderem das PCOS, zur Folge haben kann. (30)
Da 30% der von mir untersuchten Patienten, darunter ein Junge, eine Glucose/Insulin-Ratio aufwiesen, die eine Insulinresistenz nahelegt, ist bei weiblichen Patienten auch bei noch nicht sonographisch verifizierbarem PCOS die Entwicklung eines derartigen Krankheitsbildes möglich und daher eine enge Kontrolle des Glucosestoffwechsels, der Androgen-Spiegel und der ovariellen Morphologie zu empfehlen.
Ein pelviner Ultraschall ist bei den Patientinnen auf jeden Fall durchzuführen, bei denen eine übersteigerte Hormonantwort im ACTH-Test auffällt, da bei ihnen die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung oder das Vorliegen von polycystischen Ovarien im Vergleich zu anderen Patientinnen mit Prämaturer Pubarche erhöht ist (88). Das Risiko für PCOS ist aber bei allen Patientinnen mit Prämaturer Pubarche im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung erhöht, so dass wir empfehlen, bei allen Patientinnen in gewissen Abständen eine Sonographie der Ovarien durchzuführen. Die Ergebnisse des ACTH-Tests können daher lediglich einen Anhaltspunkt für die notwendige Häufigkeit der Ultraschalluntersuchungen geben (9).

5.4.9 Androgene

5.4.9.1 DHAS

Da die von mir untersuchten Patienten nicht zum Zeitpunkt der Pubarche, sondern nur in sehr unterschiedlichen Lebensaltern untersucht werden konnten, ist der zum Untersuchungszeitpunkt gemessene DHAS-Spiegel wenig aussagekräftig, um eine Prämature Adrenarche als

Ursache der Prämaturen Pubarche zu verifizieren. Denn bei der Prämaturen Adrenarche liegt zwar eine Erhöhung des DHAS-Spiegels zum Zeitpunkt der Pubarche im Altersvergleich vor, verstärkt sich aber im späteren Verlauf nicht und gleicht sich mit der Pubertät wieder an alterentsprechende Normwerte an.

Die basalen DHAS-Spiegel waren, wie gezeigt, nur bei wenigen Patienten, in beiden Gruppen bei 11%, erhöht, die aber entsprechende klinische Auffälligkeiten zeigten.

Die deutlich erhöhten Werte mit 336 µg/dl basal und 363 µg/dl nach Stimulation der Patientin Nr. 10 gingen mit folgenden Phänomenen einher: sie hatte den höchsten Behaarungscore unter den weiblichen Patienten und war mit zehn Punkten deutlich hirsut. Ausserdem hatte sie das PH-Stadium 6 und leichte Akne, was einen Effekt dieses Androgens nahelegt.

Die Patientin mit der Nummer 20 aus der Gruppe 2, bei der ähnlich hohe basale (325 µg/dl) und stimulierte (331µg/dl) DHAS-Spiegel gemessen worden waren, zeigte keinen Hirsutismus, aber ebenfalls PH 6 und schwerste Akne.

Da DHAS normalerweise im ACTH-Test nicht ansteigt, ist bei Vorliegen der genannten Zeichen des Hyperandrogenismus wie Hypertrichose, Hirsutismus und Akne eine Bestimmung des basalen DHAS-Spiegels zur Quantifizierung möglich, eine Bestimmung nach ACTH-Stimulation aber nicht weiterführend, da hiermit nicht zwischen einer adrenalen und ovariellen Herkunft unterschieden werden kann.

Wie aus den Abbildungen 22 und 23 ersichtlich, besteht sowohl zwischen dem Behaarungsscore und dem basalen DHAS-Spiegel eine signifikante Korrelation ($r=0,561$, $p<0,01$), als auch zwischen dem Akne-Schweregrads und dem basalen DHAS-Spiegel ($r=0,658$, $p<0,001$). Daher kann schon allein aus dem klinischen Schweregrad des Hyperandrogenismus auf die Höhe des DHAS-Spiegels rückgeschlossen werden. Allerdings empfehlen wir dennoch eine Bestimmung der Hormon-Spiegel, um andere Ursachen wie zum Beispiel eine Testosteronerhöhung im Rahmen einer malignen ovariellen oder adrenalen Erkrankung ausschliessen zu können.

Abbildung 22: Korrelation des Behaarungsscores mit dem basalen DHAS-Spiegel

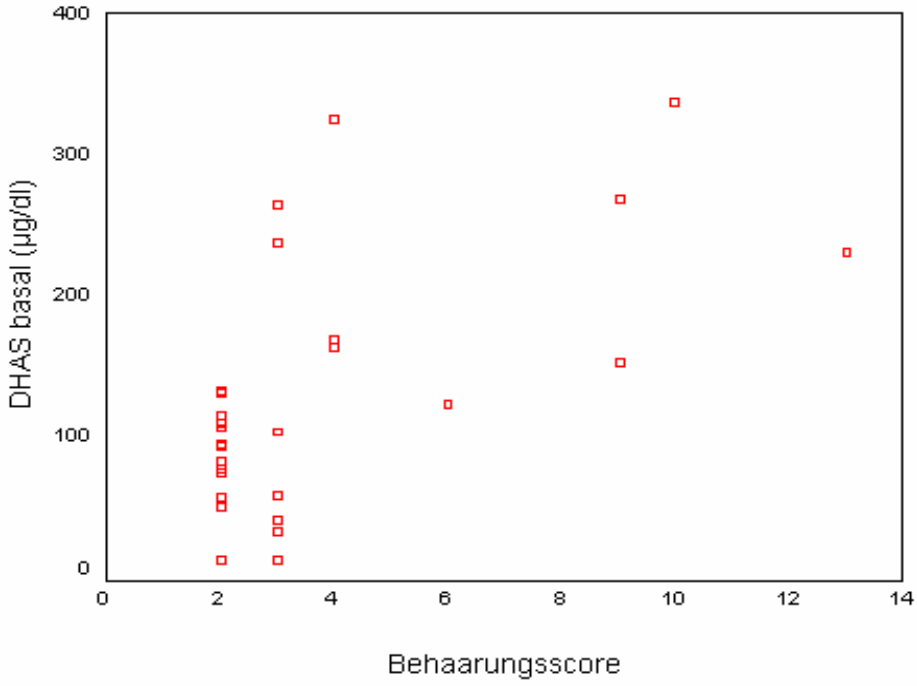
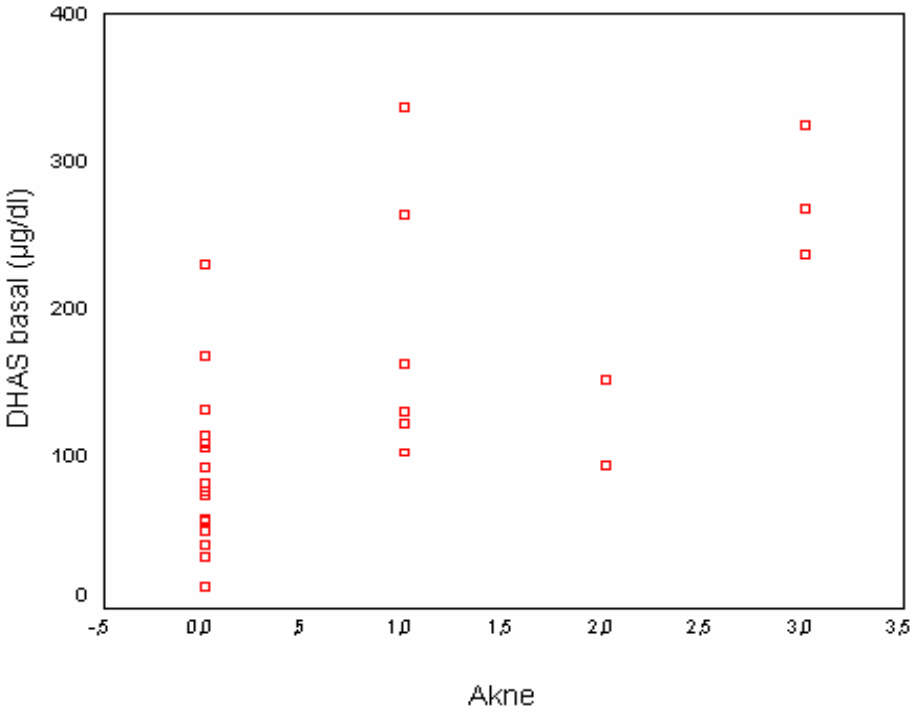


Abbildung 23: Korrelation des Akne-Schweregrads mit dem basalen DHAS-Spiegel



Bei der Patientin Nr. 27 lagen die DHAS-Werte unterhalb der normalen Streubreite, was durch eine Entwicklungsverzögerung zu erklären ist.

5.4.9.2 Androstendion

Bei Kindern mit Prämaturer Pubarche wurden schon 1972 signifikant höhere Konzentrationen an Testosteron, Dihydrotestosteron, Androstendion und DHEA im Vergleich gleichaltrigen präpubertären Kindern gefunden (40). Aufgrund unserer Messmethode konnten die Testosteron-Spiegel unserer Patienten leider nicht mit denen anderer Kollektive verglichen werden. Allerdings waren bei insgesamt 50% unserer Patienten die basalen Androstendion-Spiegel über die Normgrenze hinaus erhöht. Diese verteilten sich gleichmässig auf die beiden Gruppen. Die stimulierten Androstendionwerte waren nur bei zwei Patienten in jeder Gruppe über die Normgrenze erhöht, d.h. bei 11% der Gruppe 1 und bei 22% der Gruppe 2. Alle diese Patienten hatten bereits basal erhöhte Androstendionwerte.

Daher ist festzustellen, dass unabhängig von den 17-OHP-Werten eine Erhöhung des Androstendions bei der Hälfte der Patienten mit Prämaturer Pubarche auftritt. Androstendion ist selbst nur schwach androgen wirksam, kann aber peripher zu Testosteron umgewandelt werden (2). Trotzdem korrelierten sowohl die basalen, als auch die stimulierten Androstendionwerte mit allen Parametern der Androgeneffekte, jeweils mit einer Signifikanz von $p < 0,01$. Die Korrelationskoeffizienten sind in der folgenden Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Korrelation mit basalen und ACTH-stimulierten Androstendion-Spiegeln

	Androstendion basal mit	Androstendion stimuliert mit
Akne-Klassifikation	r = 0,758	r = 0,630
Behaarungsscore	r = 0,635	r = 0,516
PH-Stadium	r = 0,798	r = 0,820
adultem Schweissgeruch	r = 0,514	r = 0,517
Axillarbehaarung	r = 0,816	r = 0,755

Aus der Tabelle 16 ist ersichtlich, dass der stimulierte Androstendion-Spiegel eine wenig stärkere Korrelation mit dem PH-Stadium zeigt, allerdings sind insgesamt die Korrelationen mit den basalen Androstendion-Spiegeln sehr gut und rechtfertigen die Durchführung eines ACTH-Tests aus diesem Grund nicht.

Die bei unseren Patienten gefundene Korrelation einerseits zwischen dem DHAS-Spiegel und dem Leptin im Serum und andererseits zwischen dem Androstendion-Spiegel und dem IGF-1 im Serum bestätigten die Ergebnisse von *L`Allemand et al.*, denen ebenfalls aufgefallen war, dass die DHAS-Werte vor allem mit dem Leptin und den BMI korrelierten, die Androstendionwerte dagegen mit dem IGF-1 und somit der fettfreien Körpermasse. (45).

6 Zusammenfassung

Bei 28 Patienten mit Prämaturer Pubarche wurde untersucht, ob eine Heterozygotie für 21-Hydroxylase-Mangel als Ursache des symptomatischen Hyperandrogenismus vorläge. Eine Heterozygotie wurde einerseits nach *Knorr et al.* (39) angenommen, wenn der 17-OHP-Spiegel 60 min. nach ACTH-Stimulation 260 ng/dl überstieg, was bei neun Patienten (32%) der Fall war. Andererseits wurde mittels Sequenzierung des CYP21-Gens überprüft, ob bei diesen Patienten tatsächlich Mutationen nachweisbar wären. Bei keinem der neun Patienten mit pathologischem ACTH-Test konnte eine Mutation gefunden werden. Der ACTH-Test ist demnach bei Patienten mit Prämaturer Pubarche ungeeignet, eine Heterozygotie für CYP21-Mutationen nachzuweisen. Bei einem unserer Patientinnen mit normalem ACTH-Test wurde eine CYP21-Mutation nachgewiesen, was im Rahmen der Heterozygotenhäufigkeit in der Normalbevölkerung liegt. Daher ist eine Heterozygotie für 21-Hydroxylase-Mangel entgegen der bisherigen Meinung keine häufige Ursache der Prämaturen Pubarche. Somit ist eine Dysregulation des P450c17-Enzyms wahrscheinlicher, was einer zukünftigen genaueren Untersuchung bedarf.

Ein ACTH-Test ist bei Patienten mit atypischer Prämaturer Pubarche allerdings unbedingt notwendig, um ein homozygotes nicht-klassisches oder Late-onset-AGS auszuschliessen.

Unsere Patienten mit erhöhtem 17-OHP-Anstieg unterschieden sich von den anderen durch häufigere begleitend zur Pubesbehaarung aufgetretene Axillarbehaarung, niedrigere Körperhöhe, einen höheren diastolischen Blutdruck, einen erhöhten Leptin-Spiegel und einen durchschnittlich niedrigeren Cortisol-Spiegel. Der basale 17-OHP-Spiegel war bei diesen Patienten allerdings normal, erst nach ACTH-Stimulation fiel das erhöhte 17-OHP auf.

Dies rechtfertigt aber nicht die Durchführung eines ACTH-Tests bei Patienten mit typischer Prämaturer Pubarche. Vielmehr ist bei der Untersuchung der Patienten mit Prämaturer Pubarche auf die genannten klinischen Auffälligkeiten zu achten.

Insgesamt konnte bei unseren Patienten im Gegensatz zu anderen Studien kein erhöhter BMI und auch keine Erniedrigung des Geburtsgewichts festgestellt werden. Häufig wurde ein fortgeschrittenes Knochenalter festgestellt, was aber aufgrund des gleichzeitig bestehenden Wachstumsvorsprungs nicht zu einer Beeinträchtigung der Endlänge führt. Ausserdem konnte eine erhöhte trabekuläre Knochendichte nachgewiesen werden. Der schon von anderen Autoren beschriebene Hyperandrogenismus mit seinen Folgeerscheinungen war auch bei unseren Patienten nachweisbar: bei 50% bestanden basal erhöhte Androstendion-Spiegel, 14% wiesen eine Hypertrichose, 39% Akne in verschiedenen Schweregraden auf. Auch metabolische Auf-

fälligkeiten von Patienten mit Prämaturer Pubarche bestätigten sich in unserem Kollektiv: 21% zeigten einen erhöhten Gesamtcholesterin-Spiegel, 30% eine pathologische Glucose/Insulin-Ratio als Hinweis auf eine Insulinresistenz. Wir konnten ausserdem erstmals einen insgesamt erhöhten systolischen Blutdruck bei Patienten mit Prämaturer Pubarche messen.
Ich empfehle daher eine konsequente und regelmässige Nachuntersuchung von Patienten mit Prämaturer Pubarche über die Pubertät hinaus mit besonderer Beachtung klinischer Zeichen des Hyperandrogenismus wie Akne und Hirsutismus, unter Einschluss von Blutdruckmessung und Bestimmung von Cholesterin und Glucose/Insulin-Ratio zur Stoffwechselüberwachung und frühzeitigen Einschätzung des kardiovaskulären Risikoprofils. Eine Sonographie der Ovarien sollte bei allen Patientinnen aufgrund des durch Hyperandrogenismus und Insulinresistenz erhöhten Risikos eines PCOS zusätzlich in regelmässigen Abständen erfolgen.

Literaturverzeichnis

1 Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC.
Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency.
Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85: 1600-1604

2 August GP, Hung W, Mayes DM.
Plasma androgens in premature pubarche: value of 17 α-hydroxyprogesterone in differentiation from congenital adrenal hyperplasia.
J Pediatr 1975, 87: 246-249

3 Azziz R, Saenger P.
The second international symposium on the developmental aspects of androgen excess, Toronto, Canada, 20 June 2000.
Trends Endocrinol Metab 2000, 11 (8): 338-340

4 Azziz R, Zacur HA.
21-hydroxylase deficiency in female hyperandrogenism: screening and diagnosis.
J Clin Endocrinol Metab 1989, 69: 577-584

5 Balducci R, Boscherini B, Mangiantini A, Morellini M, Toscano V.
Isolated precocious pubarche: an approach.
J Clin Endocrinol Metab 1994, 79 (2): 582-589

6 Bayley N, Pinneau SR.
Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for the use with the Greulich and Pyle hand standards.
J Pediatr 1952, 40: 432-441

7 Biason-Lauber A, Zachmann M, Schoenle EJ.
Effect of Leptin on CYP17 enzymatic activities in human adrenal cells: new insight in the onset of adrenarche.
Endocrinology 2000, 141: 1446-1454

8 Blanché H, Vexiau P, Clauin S et al.
Exhaustive screening of the 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women.
Hum Genet 1997, 101 (1): 56-60

9 Bridges NA, Cooke A, Healy MJR, Hindmarsh PC, Brook CGD.
Ovaries in sexual precocity.
Clin Endocrinol 1995, 42: 135-140

10 Cole TJ, Freeman JV, Preece MA.
British 1990 growth reference centiles for weight, height, body mass index and head circumference fitted by maximum penalized likelihood.
Stat Med 1998, 17 (4): 407-429

11 Conly PW, Sandberg DH, Cleveland WW.
Steroid metabolism in premature pubarche and virilizing adrenal hyperplasia.
J Pediatr 1967, 71: 506

12 Dickerman Z, Grant DR, Faiman C, Winter JSD.
Intraadrenal steroid concentrations in man: zonal differences and developmental changes.
J Clin Endocrinol Metab 1984, 59: 1031-1036

13 Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A.
Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance and/or hyperinsulinemia.
J Clin Endocrinol Metab 1987, 65: 499-507

14 Feinberg AP, Vogelstein B.
A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal Biochem 1984, 137: 266-267

15 Ferriman D, Gallway JD.
Clinical assessment of body hair growth in women.
J Clin Endocrinol Metab 1961, 21: 1440-1447

16 Forest MG, de Peretti E, David M, Sempe M.
L`Adrenarche joue-t-elle vraiment un rôle determinant dans le developpement pubertaire? Etude des dissociations entre adrenarche et gonadarche dans les retards d`adrenarche.
Ann Endocrinol (Paris) 1982, 43: 465

17 Garcia-Mayor RV, Andrade MA, Rios M et al.
Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituary-gonadal hormones, and pubertal stage.
J Clin Endocrinol Metab 1997, 82 (9): 2849-2855

18 Gill MS, Hall CM, Tillmann V, Clayton PE.
Constitutional delay in growth and puberty (CDGP) is assiciated with hypoleptinaemia.
Clin Endocrinol (Oxf) 1999, 50 (6): 721-726

19 Granoff AB, Chasalow FI, Blethen SL.
17-Hydroxyprogesterone responses to adrenocorticotropin in children with premature adrenarche.
J Clin Endocrinol Metab 1985, 60 (3): 409-415

20 Greulich WW, Pyle SI.
Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist.
Stanford: Stanford University Press 1959

21 Gryngarten M, Bedecarras P, Ayuso S, Bergada C, Campo S.
Clinical assessment and serum hormonal profile in prepubertal hypertrichosis.
Horm Res 2000, 54: 20-25

22 Gutai JP, Kowarowski A, Migeon CJ.
The detection of the heterozygote carrier for congenital virilizing adrenal hyperplasia.
J Pediatr 1977, 90: 924-929

23 Hawkins LA, Chasalow FI, Blethen SL.
The role of adrenocorticotropin testing in evaluating girls with premature adrenarche and hirsutism/oligomenorrhea.
J Clin Endocrinol Metab 1992, 74: 248-253

24 Helmberg A, Tusie-Luna MT, Tabarelli M, Kofler R, White PC.
R339H and P453S: CYP21 mutations associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency that are not apparent gene conversions.
Mol Endocrinol 1992, 6: 1318-1322

25 Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y.
Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene.
Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83: 2841- 2845

26 Höller W, Scholz S, Knorr D et al.
Genetic differences between the salt-wasting, simple virilizing, and nonclassical types of congenital adrenal hyperplasia.
J Clin Endocrinol Metab 1985, 60 (4): 7577-7563

27 Ibanez L, Dimartino-Nardi J, Potau N, Saenger P.
Premature adrenarche-normal variant or forerunner of adult disease?
Endocr Rev 2000, 21 (6): 671-696

28 Ibanez L, Potau N, Dunger D, de Zegher F.
Precocious pubarche in girls and the development of androgen excess.
J Pediatr Endocrinol Metab 2000, 13 Suppl 5: 1261-1263

29 Ibanez L, Potau N, Chacon P, Pascual C, Carrascosa A.
Hyperinsulinaemia, dyslipaemia and cardiovascular risk in girls with a history of premature pubarche.
Diabetologia 1998, 41 (9): 1057-1063

30 Ibanez L, Potau N, Zampolli M et al.
Hyperinsulinemia in postpubertal girls with a history of premature pubarche and functional ovarian hyperandrogenism.
J Clin Endocrinol Metab 1996, 81 (3): 1237-1243

31 Ibanez L, Bonnin MR, Zampolli M et al.
Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche.
Horm Res 1995, 44 (2): 51-56

32 Ibanez L, Potau N, Virdis R et al.
Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism.
J Clin Endocrinol Metab 1993, 76 (6): 1599-1603

33 Ibanez L, Virdis R, Potau N et al.
Natural history of premature pubarche: an auxological study.
J Clin Endocrinol Metab 1992, 74 (2): 254-257

34 Illing S, Classen M.
Klinikleitfaden Pädiatrie.
Urban & Fischer Verlag München-Jena, 2000

35 Jabbar M, Pugliese M, Fort P, Recker B, Lifshitz F.
Excess weight and precocious pubarche in children: alterations of the adrenocortical hormones.
Journal of the American College of Nutrition 1991, 10: 289-296

36 Kaplowitz PB, Cockrell JL, Young RB.
Premature adrenarche.
Clin Pediatr 1986, 25: 28-34

37 Keller E.
Untersuchungen zur genetischen Diversität der 21-Hydroxylase-Defizienz.
Dissertation LMU München 1993

38 Knochenhauer ES, Cortet-Rudelli C, Cunnigham RD et al.
Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism.
J Clin Endocrinol Metab 1997, 82 (2): 479-485

39 Knorr D, Bidlingmaier F, Höller W et al.
Is heterozygosity for the steroid 21-hydroxylase deficiency responsible for hirsutism, premature pubarche, early puberty, and precocious puberty in children?
Acta Endocrinol Suppl (Copenh) 1986, 279: 284-289

40 Korth-Schutz S, Levine LS, New MI.
Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche.
J Cin Endocrinol Metab 1976, 42: 117-124

41 Krone N.
Das Adrenogenitale Syndrom (21-Hydroxylase-Mangel): Molekularbiologische Diagnostik und Genotyp-Phänotyp Korrelation von 155 nichtverwandten Patienten.
Dissertation LMU München 2001

42 Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP.
Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany.
J Clin Endocrinol Metab 2000, 85 (3): 1059-1065

43 Krone N, Roscher AA, Schwarz HP, Braun A.
Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency.
Clin Chem 1998, 44 (10): 2075-2082

44 L`Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC et al.
Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells.
J Clin Endocrinol Metab 1996, 81: 3892-3897

45 l'Allemand D, Schmidt S, Rousson V et al.
Associations between body mass, leptin, IGF-I and circulating adrenal androgens in children with obesity and premature adrenarche.
Eur J Endocrinol 2002, 146 (4): 537-543

46 Largo RH, Wälli G, Duc G, Fanconi A, Prader A.
Evaluation of perinatal growth.
Helv paediat Acta 1980, 35: 419-436

47 Lashansky G, Saenger P, Fishman L et al.
Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation.
J Clin Endocrinol Metab 1991, 73: 674-686

48 Legro RS, Finegood D, Dunaif A.
A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome.
J Clin Endocrinol Metab 1998, 83 (8): 2694-2698

49 Lucky AW, Rosenfield RL, McGuire J, Rudy S, Helke J.
Adrenal androgen hyperresponsiveness to adrenocorticotropin in women with acne or hirsutism: adrenal enzyme defects and exxagerated adrenarche.
J Clin Endocrinol Metab 1986, 62: 840-848

50 Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J.
Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory 1982

51 Marshall WA, Tanner JM.
Variations in pattern of pubertal changes in girls.
Arch Dis Child 1969, 44: 291-303

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

53 Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis.
Endocr Rev 1988, 9: 295-318

54 Morris AH, Reiter O, Geffner ME et al.
Absence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia in patients with precocious adrenarche.
J Clin Endocrinol Metab 1989, 69: 709-715

55 Mornet E, Crété P, Kuttenn F et al.
Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency.
Am J Hum Genet 1991, 48: 79-88

56 Mullis K, Faloona F, Scharf S et al.
Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1986, 51 (1): 263-273

57 Neu CM, Manz F, Rauch F, Merkel A, Schoenau E.
Bone densities and bone size at the distal radius in healthy children and adolescents: a study using peripheral quantitative computed tomography.
Bone 2001, 28: 227-232

58 Nevinny-Stickel C, Bettinotti MP, Andreas A et al.
Non-radioactive HLA class typing using polymerase chain reaction and digoxigenin-11-2`-3`-dideoxyuridine-triphisphate labeled oligonucleotide probes.
Hum Immunol 1991, 31: 7-13

59 Nevinny-Stickel C, Hinzpeter M, Andreas A, Albert ED.
Non-radioactive oligotyping for HLA-DR1-DRw10 using polymerase chain reaction, digoxigenin-labeled oligonucleotides and chemiluminescence detection.
Europ J Immunogen 1991, 18: 323-332

60 New MI, Lorenzen F, Lerner AJ et al.
Genotyping 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data.
J Clin Endocrinol Metab 1983, 57 (2): 320-326

61 Oberfield SE, Mayes DM, Levine LS.
Adrenal steroidogenic function in a Black and Hispanic population with precocious pubarche.
J Clin Endocrinol Metab 1990, 70: 76-82

62 Owerbach D, Crawford YM, Draznin MB, Carpenter RJ, Greenberg F.
Prenatal diagnosis of 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia using the polymerase chain reaction.
Hum Genet 1992, 89: 109-110

63 Pang S.
Precocious thelarche and premature adrenarche.
Pediatr Ann 1981, 10: 29-34

64 Parker L, Lifrak E, Gelfand R et al.
Isolation, purification, synthesis and binding of human adrenal gland cortical androgen stimulatig hormone.
Endocr J 1993, 1: 441-445

65 Prader A, Largo RH, Molinari L, Issler C.
Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zürich longitudinal study of physical growth and development.
Helv Paediatr Acta Suppl 1989, 52: 1-125

66 Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.
De Gruyter Berlin-New York, 1994

67 Remer T, Manz F.
Role of nutritional status in the regulation of adrenarche.
J Clin Endocrinol Metab 1999, 84: 3936-3944

68 Rich BH, Rosenfield RL, Lucky AW, Helke JC, Otto P.
Adrenarche: changing adrenal response to adrenocorticotropin.
J Clin Endocrinol Metab 1981,m 52: 1129-1136

69 Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD.
Molecular caracterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia.
EMBO J 1987, 6: 1653-1661

70 Rosenfield RL.
Normal and almost normal precocious variations in pubertal development premature pubarche and premature thelarche revisited.
Horm Res 1994, 41 Suppl 2: 7-13

71 Rosenfield RL, Rich BH, Lucky AW.
Adrenarche as a cause of benign pseudopuberty in boys.
J Pediatr 1982, 101: 1005-1009

72 Saenger P, Dimartino-Nardi J.
Premature adrenarche.
J Endocrinol Invest 2001, 24 (9): 724-733

73 Saenger P, Reiter EO.
Editorial: premature adrenarche: a normal variant of puberty?
J Clin Endocrinol Metab 1992, 74: 236-238

74 Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al.
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase.
Science 1988, 239: 487-491

75 Sakkal-Alkaddour A, Zhang L, Yang X et al.
Studies of 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase genes in infants and children manifesting premature pubarche and increased adrenocorticotropin-ctimulated Δ^5 steroid levels.
J Clin Endocrinol Metab 1996, 81 (11): 3961-3966

76 Schiebinger RJ, Albertson BD, Cassorla FG et al.
The developmental changes in plasma adrenal androgens during infancy and adrenarche are associated with changing activities of adrenal microsomal 17-hydroxylase and 17,20-desmolase.
J Clin Invest 1981, 67: 1177-1182

77 Schoenau E, Neu MC, Rauch F, Manz F.
The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence.
J Clin Endocrinol Metab 2001, 86 (2): 613-618

78 Siegel SF, Finegold DN, Urban MD, McVie R, Lee PA.
Premature pubarche: etiological heterogeneity.
J Clin Endocrinol Metab 1992, 74 (2): 239-247

79 Siegel SF, Finegold DN, Lanes R, Lee PA.
ACTH stimulation tests and plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in women with hirsutism.
N Engl J Med 1990, 323: 849-854

80 Silfen ME, Manibo AM, McMahon DJ et al.
Comparison of simple measures of insulin sensitivity in young girls with premature adrenarche: the fasting glucose to insulin ratio may be a simple and useful measure.
J Clin Endocrinol Metab 2001, 86 (6): 2863-2868

81 Silverman SH, Migeon CJ, Rosenberg E, Wilkin SL.
Precocious growth of sexual hair without other sexual development; “premature pubarche“, a constitutional variation of adolescence.
Pediatrics 1952, 10: 426-432

82 Sopher AB, Thornton JC, Silfen ME et al.
Prepubertal girls with premature adrenarche have greater bone mineral content and density than controls.
J Clin Endocrinol Metab 2001, 86 (11): 5269-5272

.83 Southern EM.
Detection of specific sequences among DNA-fragments seperated by gel electrophoresis.
J Mol Biol 1975, 98: 503-517

84 Speiser PW, Dupont B, Zhu D et al.
Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency.
J Clin Invest 1992, 90: 584-595

85 Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P et al.
High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency.
Am J Hum Genet 1985, 37: 650-667

86 Talbot NB, Butler AM, Berman RA, Rodriguez PM, McLachnan EA.
Excretion of 17-ketosteroids by normal and by abnormal children.
Am J Dis Child 1943, 65: 364-375

87 Task Force on Blood Pressure Control in Children.
Report of the second task force on blood pressure control in children–1987.
Pediatrics 1987, 79: 1-25

88 Teixeira RJ, Silva VC, Gazolla HM, Cunha SB, Guimaraes MM.
The relationship between ovarian structure and serum insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein (IGFBP-1 and IGFBP-3) levels in premature pubarche.
J Pediatr Endocrinol Metab 2002, 15 (1): 69-75

89 Temeck JW, Pang S, Nelson C, New MI.
Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche.
J Clin Endocrinol Metab 1987, 64: 609-617

90 Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC.
Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus.
J Biol Chem 1990, 265: 20916-20922

91 Wedell A, Ritzén EM, Haglund-Stengler B, Luthman H.
Steroid 21-hydroxylase deficiency: three aditional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationship of common mutations.
Proc Natl Acad Sci USA 1992, 89: 7232-7236

92 Wedell A, Stengler B, Luthman H.
Characterization of mutations on the rare duplicated C4/CYP21 haplotype in steroid 21-hydroxylase deficiency.
Hum Genet 1994, 94: 50-54

93 Wedell A, Thilen A, Ritzen EM, Stengler B, Luthman H.
Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation.
J Clin Endocrinol Metab 1994, 78: 1145-1152

94 Wedell A.
Molecular approaches for the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia.
Clin Lab Med 1996, 16 (1): 125-137

95 Weil J, Bidlingmaier F, Sippel WG, Butenandt O, Knorr D.
Comparison of two tests for heterozygosity in congenital adrenal hyperplasia (CAH).
Acta Endocrinol 1979, 91: 109-121

96 White PC, New MI, Dupont B.
Structure of human steroid 21-hydroxylase genes.
Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83: 5111-5115

97 Wilkins L.
The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence. Springfield, CC Thomas, 1968

Anhang – Originaldaten

Pat.-Nr	Geschlecht	Geburts-Gewicht (g)	SDS Geburts-Gewicht	Geburtslänge (cm)	SSW	Pubarche (a)	Axillarbehaar-ung bei Erstvor-stellung
1	w	1080	-3,57	43	31	5	0
2	w	3230	-0,23	51	40	4,5	0
3	w	2540	-0,59	52	37	5	0
4	w	3500	0,45	55	40	5,75	0
5	w	2090				4,5	1
6	m	1630	-2,18	42	35	7	0
7	w	3010	-0,78	49	40	6,75	1
8	w	3450	0,67	51	39	5,3	0
9	w	3600	0,40	53	41	0,8	0
10	w	3850	1,33	52	40	7	0
11	w	2780	-1,35	48	40	8	0
12	w	3700	0,95	53	40	3	0
13	m					8	0
14	w					6	0
15	w	3150	-0,43	51	40	4	0
16	w	2610				6,1	1
17	w	4860	3,85	56	40	8,75	1
18	m	2030	-1,14	43	35	7,5	0
19	w					7,5	0
20	w	3100	-0,82	50	41	6	1
21	w	3430	0,28	48	40	4	0
22	w	3120	-0,12	50	39	7,6	1
23	w	2930	-0,98	50	40	6,75	1
24	w	2900	-1,30	50	41	8,5	1
25	w	3470	0,38	54	40	7,6	1
26	w	2920	-1,26	54	41	6,75	2
27	w	3470	0,38	50	40	6	0
28	m	3010	-1,24	50	40	5,5	0

Pat.-Nr.	Adulter Schweissge-ruch b.E.	Alter (a) b.E.	Latenz (a)	Höhe (cm) b.E.	SDS Höhe b.E.	SDS Höhe b.E. nach BA	Gewicht (kg) b.E.
1	0	5,20	0,20	113,1	0,55	0,87	17,8
2	0	5,50	1,00	116,5	0,91	0,53	19,7
3	1	5,78	0,78	115,2	0,18	-0,15	20,4
4	0	5,79	0,04	118,1	0,85		19,5
5	0	7,73	3,23	131,1	1,03		28,5
6	0	7,59	0,59	135,1	1,45	-0,02	30,8
7	0	7,12	0,37	130,7	1,73	0,61	25,3
8	0	5,27	-0,03	121,3	2,46	0,07	24,5
9	0	0,86	0,06	72,5	0,05		8,72
10	0	7,72	0,72	131,1	1,05		26,3
11	0	8,02	0,02	130,1	0,46	-0,52	24,6
12	0	4,21	1,21	113	2,29	0,07	19,1
13	0	8,40	0,40	135,7	0,66	-0,72	42
14	0	6,93	0,93	118,2	-0,74	-2,05	29,8
15	0	5,17	1,17	104,2	-1,60	-2,41	19,6
16	1	6,27	0,17	113,8	-0,85	-0,71	24
17	0	8,90	0,15	139,1	1,22	0,12	42,1
18	0	7,59	0,09	130,1	0,54	-0,86	31,3
19	1	7,76	0,26	134,8	1,79	-0,64	31
20	1	8,21	2,21	130,1	0,22	-1,11	27
21	0	6,14	2,14	124	1,69	-0,20	26,5
22		7,86	0,26	124	-0,65		26,5
23	0	7,37	0,62	123,4	-0,17		22
24	0	9,13	0,63	134,2	-0,01	-1,38	28,5
25	0	7,82	0,22	125	-0,38	-1,55	32,1
26	0	7,25	0,50	128,2	1,03		25,5
27	0	6,58	0,58	107	-2,79	-2,70	15
28	0	7,40	1,90	127,7	0,31	-0,34	38,8

Pat-Nr.	BMI (kg/m^2) b. E.	SDS BMI b. E.	Gewicht für Höhe (%) b. E.	BA (a) b. E.	Verhältnis BA/CA b. E.	Differenz BA-CA (a) b.E.	Prognostische Endlänge (cm) b.E.
1	13,9	-1,19	92	5	0,96	-0,20	
2	14,5	-0,67	96	5,75	1,04	0,25	
3	15,4	-0,06	102	6	1,04	0,22	160,00
4	14,0	-1,09	92				
5	16,6	0,36	105				
6	16,9	0,74	106	9	1,19	1,41	187,64
7	14,8	-0,56	94	8	1,12	0,88	165,44
8	16,7	0,74	108	6,83	1,30	1,56	
9	16,6	-0,61	97				
10	15,3	-0,34	97				
11	14,5	-0,88	92	8,83	1,10	0,81	158,47
12	15,0	-0,50	99	5,5	1,31	1,29	
13	22,8	2,65	143	10	1,19	1,60	181,66
14	21,3	2,34	140	8	1,15	1,07	157,60
15	18,1	1,49	118	5,75	1,11	0,58	
16	18,5	1,54	122	6,17	0,98	-0,10	158,06
17	21,8	1,97	135	10	1,12	1,10	168,00
18	18,5	1,52	118	9	1,19	1,41	180,69
19	17,1	0,59	107	10	1,29	2,24	162,80
20	16,0	-0,06	101	9,5	1,16	1,29	160,82
21	17,2	0,97	111	7,5	1,22	1,36	169,40
22	17,2	0,64	111				
23	14,4	-0,85	93				
24	15,8	-0,33	99	10,5	1,15	1,37	156,78
25	20,5	1,88	132	8,83	1,13	1,01	159,44
26	15,5	-0,14	99				
27	13,1	-1,84	86	6,5	0,99	-0,08	144,99
28	23,8	3,18	153	8	1,08	0,60	176,63

Pat-Nr.	SDS Prognost. End-länge b. E.	Höhe Mutter (cm)	Höhe Vater (cm)	Untere Grenze der MFZ (cm)	Mittlere familiäre Zielgrösse = MFZ (cm)	Obere Grenze der MFZ (cm)	SDS MFZ
1		170	182	161,0	169,5	178,0	0,8
2		170	174	157,0	165,5	174,0	0,1
3	-0,80	164	180	157,0	165,5	174,0	0,1
4		170	178	159,0	167,5	176,0	0,5
5		168	170	154,0	162,5	171,0	-0,4
6	1,40	168	185	174,5	183,0	191,5	0,7
7	0,10	170	178	159,0	167,5	176,0	0,5
8		161	177	154,0	162,5	171,0	-0,4
9		167	187	162,0	170,5	179,0	1,0
10		169	175	157,0	165,5	174,0	0,1
11	-1,00	170	170	155,0	163,5	172,0	-0,2
12		167	190	163,5	172,0	180,5	1,2
13	0,50	150	155	150,5	159,0	167,5	-2,7
14	-1,20	155	170	147,5	156,0	164,5	-1,5
15		173	185	164,0	172,5	181,0	1,3
16	-1,10	164	173	153,5	162,0	170,5	-0,4
17	0,60	168	180	159,0	167,5	176,0	0,5
18	0,40	168	185	174,5	183,0	191,5	0,7
19	-0,30	166	179	157,5	166,0	174,5	0,2
20	-0,60	166	180	158,0	166,5	175,0	0,3
21	0,80	157	190	158,5	167,0	175,5	0,4
22		151	175	148,0	156,5	165,0	-1,4
23		162	180	156,0	164,5	173,0	0,0
24	-1,30	156	190	158,0	166,5	175,0	0,3
25	-0,90	159,5	176	152,8	161,3	169,8	-0,6
26		162	170	151,0	159,5	168,0	-0,9
27	-3,30	164	178	156,0	164,5	173,0	0,0
28	-0,20	162	167	162,5	171,0	179,5	-1,0

Pat-Nr.	Menarche Mutter (a)	Menarche Patient (a)	Alter (a) bei Untersuchung	Höhe (cm) b. U.	SDS Höhe b. U.	SDS Höhe b. U. korrigiert nach BA	Gewicht (kg) b. U.
1			11,84	153,4	0,65		34,2
2	12	11	12,73	165,1	1,61		57,3
3	12	12	12,95	160,3	0,73		50,7
4	13		11,26	158,1	1,99	0,72	36,9
5	11,5		11,44	150,0	0,53	0,47	39,7
6	10		10,71	158,7	2,36		48,1
7	12,5		8,64	139,4	1,61		29
8	11	11,5	13,11	170,6	2,19	1,37	56,1
9	12		5,33	112,0	0,08		16,5
10	14	12	18,54	168,7	0,73		63,9
11	13,5		9,14	137,5	0,63	-0,16	28,3
12	12	12	19,97	183,2	3,14		70,6
13	12		9,83	143,5	0,67	-1,24	49
14	12		11,64	145,6	-0,33		55
15	15,5		9,12	139,0	0,94		32,5
16	13		7,14	120,4	-0,53		29,8
17	14		9,97	146,3	1,42	0,91	48,4
18	10		10,71	155,0	1,78		45,2
19	12		9,04	142,2	1,67	-0,35	35,5
20	13,5	12	15,28	163,9	0,13		66,8
21	12	12	18,77	166,6	0,37		67,2
22	14		11,59	146,6	-0,13		43,5
23	12,5		8,35	129,1	-0,16		24,3
24	15	13	14,60	161,3	-0,13		54,5
25	12		8,86	132,8	0,00	-1,00	38,2
26	11		8,25	134,8	1,16	0,23	31,3
27	13		10,53	124,2	-3,37		23,4
28	14,5		7,81	131,6	0,56		40

Pat-Nr.	BMI (kg/m²) b. U.	SDS-BMI b. U.	Akne b. U.	Behaarungsscore b. U.	Axillarbehaarung B. U.	Adulter Schweiss-geruch B. U.	*Tanner* B b. U.	*Tanner* PH b. U.
1	14,5	-1,92	0	3	1	1	3	5
2	21,0	0,88	0	4	2	2	5	6
3	19,7	0,39	3	3	3	2	5	5
4	14,8	-1,57	1	4	1	1	2	4
5	17,6	-0,05	0	2	2	2	3	4
6	19,1	1,04	1	3	2	2		3
7	14,9	-0,75	0	3	1	2	1	2
8	19,3	0,17	2	2	3	0	4	6
9	13,2	-1,87	0	2	0	0	1	2
10	22,5	0,39	1	10	3	2	5	6
11	15,0	-0,83	0	2	0	0	1	3
12	21,0	-0,26	0	13	3	2	5	6
13	23,8	2,49	0	2	0	0		3
14	25,9	2,28	1	2	1	1	2	5
15	16,8	0,18	0	3	0	2	2	3
16	20,6	2,06	0	2	2	1	1	2
17	22,6	1,93	0	2	2	2	2	3
18	18,8	0,93	1	3	2	1		3
19	17,6	0,53	0	2	1	1	1	3
20	24,9	1,46	3	4	3	2	5	6
21	24,2	0,91	3	9	3	2	5	6
22	20,2	0,90	1	6	2	1	2	3
23	14,6	-0,92	0	2	1	0	1	3
24	20,9	0,45	2	9	3	2	5	5
25	21,7	1,95	0	2	1	1	2	3
26	17,2	0,56	0	2	2	2	1	3
27	15,2	-1,07	0	3	0	0	1	3
28	23,1	2,89	0	2	0	0		2

Pat-Nr.	*Tanner* G b. U.	Hodenvolumen (ml) links b. U.	Hodenvolumen (ml) rechts b. U.	BA (a) b. U.	BA/CA b. U.	BA-CA (a) b. U.	Prognostische Endlänge (cm) b. U.	SDS Prognost. Endlänge (cm) b. U.
1								
2								
3								
4				12,5	1,11	1,24	171,5	1,2
5				11,5	1,01	0,06	164,1	-0,1
6	2	3	2					
7								
8				15	1,14	1,89	173,0	1,4
9								
10								
11				10	1,09	0,86	159,5	-0,9
12								
13	1	2	2	12,5	1,27	2,67	177,4	-0,1
14								
15								
16								
17				10,63	1,07	0,66	164,4	0,0
18	3	3	3					
19				11	1,22	1,96	161,0	-0,6
20								
21								
22								
23								
24								
25				10	1,13	1,14	160,4	-0,7
26				9	1,09	0,75	163,0	-0,3
27								
28	2	2	2					

Pat-Nr.	Systolischer Blut-druck (mmHg)	SDS syst. Blut-druck	Diastolischer Blutdruck (mmHg)	SDS diast. Blut-druck	Cholesterin (mg/dl)	HbA_1c (%)	Lactat (mmol/l)
1	110	0,49	75	1,04	151	5,4	1,7
2	111	0,30	53	-1,45	213	5	0,9
3	123	1,35	69	0,20	153	4,7	1,5
4	115	0,94	64	-0,05	150	5	1,2
5	114	0,85	72	0,74	174	4,6	1,1
6	119	1,63	63	-0,06	242	5,2	2,1
7	120	2,11	70	0,89	150	5	1,8
8					136	5,2	3,4
9	83	-1,05	50	-0,74	193	5,4	2,8
10	112	0,18	62	-0,52	138	4,8	0,8
11	98	-0,20	52	-1,05	169	5,3	2,8
12	119	0,83	72	0,44	178		1,8
13	107	0,62	68	0,54	212	5,2	1,7
14	119	1,25	78	1,34	184	5,3	1,5
15	99	-0,11	54	-0,85	218	5,2	2,5
16	98	0,16	61	0,13	230		4
17	102	0,17	66	0,32	148	5,1	
18	104	0,20	59	-0,48	239	5,4	1,5
19					164	5,3	2,9
20	123	1,36	73	0,67	170	4,8	1,6
21	128	1,65	74	0,63			
22	109	0,40	57	-0,74	188	4,4	1,6
23	113	1,43	66	0,50	146	5,2	1,5
24	128	1,71	91	2,21	179	4,7	1,1
25	81	-1,68	63	0,20	150	5,6	1
26					189	5,1	1
27	103	0,11	76	1,30	186		4,2
28	120	2,13	75	1,40	186	5	1,6

Pat-Nr.	Glucose (mg/dl)	Insulin (µE/ml)	Glucose/ Insulin-Ratio (mg/dl : µE/ml)	C-Peptid (ng/ml)	Leptin (ng/ml)	TSH (mU/l)	fT4 (ng/dl)
1	89					2,64	1,6
2	86	14	6,1	2,5	9,9	2,55	1,2
3	83	17	4,9	2,2		2,26	1,2
4	80	14,1	5,7	2,8	1	1,66	1,3
5	80	10,4	7,7	1,3	5,2	2,07	1,3
6	102	14,5	7,0	2,2	8,9	2,01	1,1
7	67	16,6	4,0	0,8	1,6	1,67	1,1
8	84				7,4	1,85	1,1
9	82	9,8	8,4	2,3	0,7	2,79	1,2
10	77	10,2	7,5	2,5	10	1,65	1,2
11	86	14,1	6,1	2,1	3	1,69	1,2
12	84	7,6	11,1	1,8	10,5	0,7	1,3
13	100	36,4	2,7	5,2	11,5	1,47	1,4
14	85	33	2,6	3,1	24,4	2,91	1,1
15	79	4,5	17,6	0,6	3,6	2,33	1,2
16	89	68,1	1,3	7	9,1	3,36	1,2
17	85	19,7	4,3		12,6	4,86	1
18	103	8,5	12,1	1,7	7,5	1,16	1,2
19	102					1,5	1,2
20	84	20,6	4,1	1,4	16,2	3,27	1,2
21					19,4		
22	86	12,7	6,8	1,8	7,2	2,4	
23	85	15	5,7	3,1	0,6	1,47	1,3
24	74	11,1	6,7	2,7	6		
25	78				18,4	1,97	1
26	73	7,7	9,5	1,1	4,9	2,25	1,5
27	61	16,1	3,8	3,1	2,6	0,77	1,1
28	69	9,9	7,0	1,4	24,7	1,15	1,4

Pat.Nr.	DHAS (µg/dl) basal	DHAS (µg/dl) stimuliert	Testosteron (ng/dl) basal	Testosteron (ng/dl) stimuliert	Androstendion (ng/dl) basal	Androstendion (ng/dl) stimuliert	Δ-Androstendion (ng/dl)
1	43	45	<15	<15	85	104	19
2	169	148	49	49	107	149	42
3	238	242	29	56	274	291	17
4	164	146	21	26	96	127	31
5	134	134	<15	<15	92	128	36
6	265	275	<15	19	116	138	22
7	59	61	<15	<15	60	90	30
8	95	75	46	50	136	193	57
9	15	19	<15	<15	32	34	2
10	336	363	31	38	237	297	60
11	58	34	<15	17	63	89	26
12	230	246	46	63	320	399	79
13	76	74	<15	<15	35	89	54
14	132	133	32	34	155	163	8
15	34	35	<15	<15	67	104	37
16	116	122	<15	<15	81	81	0
17	51	62	<15	<15	37	72	35
18	105	106	<15	18	111	123	12
19	84	87	<15	20	88	124	36
20	325	331	33	49	271	241	-30
21	269	295	26	33	192	287	95
22	124	177	<15	<15	117	114	-3
23	111	101	<15	<15	60	120	60
24	154	156	19	32	119	176	57
25	78	73	16	21	60	179	119
26	94	87	<15	<15	76	125	49
27	15	13	<15	<15	44	80	36
28	107	104	<15	<15	29	74	45

Pat-Nr.	Cortisol (µg/dl) basal	Cortisol (µg/dl) stimuliert	17-OHP (ng/dl) basal	17-OHP (ng/dl) stimuliert	Δ-17-OHP (ng/dl)	LH (mU/ml)	FSH (mU/ml)
1	18,99	37,6	98	178	80	<0,5	1,8
2	11,3	27,3	86	169	83	1,3	1,2
3	13,2	29,6	133	223	90	2,5	1,9
4	13,5	33,52	103	194	91	<0,5	2,3
5	9,4	27,9	58	174	116	<0,5	2,1
6	18,9	49,8	120	249	129	<0,5	<0,5
7	7,09	39,76	48	185	137	<0,5	1,1
8	7,3	32,3	97	261	164	8,2	3,5
9	14	42	70	246	176	<0,5	<0,5
10	17,6	46	157	334	177	3,8	3,2
11	10,2	40	64	244	180	<0,5	0,8
12	14,8	36,7	108	312	204	6	4,7
13	4,19	37,53	39	244	205	<0,5	<0,5
14	8,1	36,8	74	279	205	1,5	2,4
15	12,82	42,16	108	322	214	<0,5	0,8
16	20	37,8	235	464	229	<0,5	0,8
17	14,7	38,4	124	355	231	<0,5	0,6
18	11,98	43,3	83	315	232	<0,5	<0,5
19	14,89	36,05	128	382	254	<0,5	0,8
20	14,5	37	409	672	**263**	1,8	1,3
21	11,5	34,4	199	467	**268**	4,7	0,6
22	11,6	35,5	118	438	**320**	1,2	2,9
23	9,7	44,8	61	396	**335**	<0,5	1
24	5,8	34,7	109	477	**368**	1,1	2,8
25	2,6	41	41	444	**403**	<0,5	0,7
26	10	45,2	81	581	**500**	<0,5	1,3
27	5,7	45,1	54	712	**658**	1,5	1,4
28	6,6	38,2	53	791	**738**	<0,5	<0,5

Pat-Nr.	IGF-1 (ng/ml)	Gesamtdichte (g/cm^3) distal	SDS Gesamtdichte distal	Gesamtfläche (mm^2) distal	SDS Gesamtfläche distal	Trabekuläre Dichte (g/cm^3) distal	SDS Trabekuläre Dichte distal
1	218	284,4	0,09	304,0	1,72	229,00	1,06
2	375	373,1	2,00	368,3	1,97	299,90	3,22
3	244	254,2	-1,05	285,0	0,45	142,20	-1,71
4	180	248,6	-0,90	334,0		208,90	0,50
5	171	241	-1,11			208,00	0,47
6	235	339,2	1,49	309,0	1,73	279,40	2,67
7	174						
8	408	240,4	-0,66		0,75	187,20	-1,78
9	83		0,86				-0,25
10	174	305,2	0,68	323,0	0,67	168,90	-0,75
11	165	301,6	0,85	268,5	3,34	234,60	2,11
12	186	264,8	-2,15	460,3	3,94	161,70	-0,95
13	124						
14	268	253,9	-0,75			191,30	0,01
15	227	285,9	0,13	249,5		231,80	1,56
16	154	312,7	0,60	185,0	0,70	257,80	2,17
17	169	264,4	-0,85	321,0	5,44	217,30	1,36
18	220	300,4	2,27	342,8	2,64	300,40	3,28
19	125						
20	248	278,4	-0,66	298,3	0,04	167,90	-0,48
21	203	353,4	-0,35	324,3	0,70	192,30	-0,08
22	200	240,4	-1,13			187,20	-0,11
23	137	330,7	2,17	209,3	0,97	315,10	5,61
24	223	282	-0,57	387,0		200,50	0,86
25	183	339,2		309,0		279,40	
26	184	274,3	-0,40	460,3	-0,50	215,10	1,27
27	188						
28	154	298,1	-0,23	251,5	2,50	251,90	1,43

Pat-Nr.	Kortikale Dichte (g/cm^3) proximal	SDS Kort. Dichte (g/cm^3) proximal	Kortikale Dicke (mm) proximal	SDS Kortikale Dicke proximal	Kortikale Fläche proximal (mm^2)	SDS Kortikale Fläche	Muskelfläche (mm^2)	SDS Muskelfläche
1	1008,40	-0,34	1,75	-0,23	60,00	0,82	1572,80	-1,71
2	967,40	-1,48	1,82	-0,62	76,80	0,99	3193,50	1,62
3	1086,10	1,04	1,93	-0,41	64,80	0,24	2355,00	-0,34
4								
5	1029,00	0,22	1,60	-0,61	49,30	-0,15	2121,00	-0,20
6	1001,30	-0,64	1,32	-1,78	45,50	-0,81	2466,50	0,60
7								
8	1024,40	1,44	2,03	0,22	76,30	0,96	2890,00	0,91
9								
10	1094,70	-1,46	1,95	-1,39	74,50	0,35	2774,00	-0,15
11	1016,80	-0,59	1,81	0,37	41,00	-0,25	1750,00	-0,23
12	1146,30	0,46	2,39	-0,09	91,50	2,05	2756,30	-0,20
13								
14	998,80	-0,60	2,07	0,57	70,50	1,77	2265,70	0,20
15								
16								
17	1060,10	1,12	1,98	0,85	63,80	2,60	2570,50	2,84
18	998,40	-0,72	1,41	-1,41	47,00	-0,63	2257,70	-0,01
19								
20	1035,90	-0,89	2,19	-0,55	72,30	0,26	2933,00	0,73
21	1153,50	0,72	2,44	0,07	83,80	1,28	3099,70	0,75
22	1024,40	0,09	2,03	0,48	61,50	0,95	2134,00	-0,17
23	970,00	-0,68	1,31	-1,05	42,30	-0,09	1689,50	-0,43
24	1088,60	-0,16	2,17	-0,61	64,30	-0,63	2569,50	-0,42
25	1001,30		1,32					
26	986,10	-0,36	1,21	-1,33	32,50	-1,31	1531,80	-1,05
27								
28	1001,10	0,58	1,25	-0,64	38,30	0,16	2048,50	2,01

Lebenslauf

Name:	Daniela Susanne Schenk
Geburtsdatum/-ort:	11.12.1975 in Roth
Adresse:	Forstenrieder Allee 193 81476 München
Familienstand:	verheiratet

Schulausbildung

1982-1995	an der Rudolf-Steiner-Schule Nürnberg
30.06.1995	Abitur am Hans-Sachs-Gymnasium Nürnberg

Au Pair

07-12/1995	Genf, Schweiz

Studium

03/ 1996-01/1997	Deutsch und Französisch an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
seit 03/1997-04/2003	Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
23.03.1999	Ärztliche Vorprüfung
23.03.2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10.04.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15.04.2002- 24.01.2003	Praktisches Jahr in den Fächern Innere Medizin, Kinderchirurgie und Pädiatrie
09.04.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Tätigkeiten

01.08.2003-30.11.2003	Kinderklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg als Ärztin im Praktikum
01.12.2003-30.09.2004	Kinderklinik der Technischen Universität München als Ärztin im Praktikum
Seit 01.10.2004	Kinderklinik der Technischen Universität München als Assistenzärztin