

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

(Direktor: Prof. Dr. med. M. Schrappe)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Backdoorpathway zu Dihydrotestosteron

Entwicklung einer Massenspektrometriemethode zur Bestimmung der Backdoorpathway Steroide Androsteron und Androstandiol im Serum/Plasma mit retrospektiver Analyse eines Kontrollkollektivs und einer Kohorte mit Adrenogenitalem Syndrom.

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Helena Kristina Wulf

aus **Kiel**

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus,
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dominik M. Schulte,
Klinik für Innere Medizin I

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 16.12.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
Vorsitzender des Ausschusses für Promotion

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung	1
1.1 Adrenogenitales Syndrom (AGS)	1
1.2 Δ 5-Pathway.....	3
1.3 Dihydrotestosteron (DHT)	3
1.4 Backdoorpathway (BP)	4
1.5 Adrenogenitales Syndrom und der Backdoorpathway	7
1.6 Fragestellung	7
2. Material und Methodik	9
2.1 Patienten.....	9
2.2 Massenspektrometrie.....	10
2.2.1 Eintunen	12
2.2.2 Auswertung	12
2.3 Probenverarbeitung	13
2.4 Intra- und Interassayvarianz.....	13
2.5 Statistische Verfahren	14
3. Ergebnisse	15
3.1 DHT	16
3.2 Backdoorpathway Steroide	18
3.2.1 Geschlechtsunterschied	19
3.2.2 Vergleich der Kontrollkohorte mit der 21-Hydroxylasemangel-Kohorte (21-OHD).....	19
3.2.3 Vergleich von Neudiagnosen und Kontrollpatientinnen und -patienten beziehungsweise 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie	21
3.2.4 Vergleich von gut und laborchemisch ungenügend eingestellten 21-OHD-Patientinnen und -Patienten	22
3.2.5 Urin.....	23
3.3 Korrelation zwischen BP und klinischen Daten	24
3.3.1 Wachstumsgeschwindigkeit.....	24
3.3.2 Body-Maß-Index (BMI)	25
3.3.3 CYP21A2-Genotyp	26
3.4 Korrelation zwischen Steroiden beziehungsweise Hormonen	27
3.4.1 Androstandiol	29
3.4.2 Androsteron.....	29

3.4.3 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP)	29
3.4.4 Testosteron/ Androstendion.....	30
3.4.5 DHT.....	30
3.5 Quotient Backdoorpathway zu klassischem Pathway.....	30
4. Diskussion.....	33
4.1 DHT	33
4.2 Backdoorpathway Steroide	34
4.2.1 Geschlechterunterschied	35
4.2.2 Vergleich der Kontrollkohorte mit der 21-OHD-Kohorte	35
4.2.3 Vergleich von Neudiagnosen und Kontrollpatientinnen und -patienten beziehungsweise 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie	36
4.2.4 Vergleich von gut und laborchemisch ungenügend eingestellten 21-OHD- Patientinnen und -Patienten	37
4.2.5 Urin.....	38
4.3 Korrelation zwischen BP und klinischen Daten	39
4.3.1 Wachstumsgeschwindigkeit.....	39
4.3.2 BMI.....	40
4.3.3 CYP21A2-Genotyp	41
4.4 Korrelation zwischen Steroiden beziehungsweise Hormonen	41
4.4.1 Androstandiol	41
4.4.2 Androsteron.....	42
4.4.3 17-OHP	43
4.4.4 Testosteron/Androstendion.....	43
4.4.5 DHT.....	44
4.5 Quotient Backdoorpathway zu klassischem Pathway.....	45
4.6 Fazit.....	46
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis	49
7. Anhang.....	52
7.1 Varianz und Qualitätskontrolle	52
7.2 Expressionsdaten der BP-Enzyme.....	54
7.3 Messergebnisse der Steroide und Hormone des klassischen Weges	59
7.4 Ethikantrag.....	60
7.5 Danksagung.....	61
7.6 Eidesstattliche Erklärung.....	62
7.7 Veröffentlichungen	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Flussdiagramm 21-OHD aus Turcu et al. (1)	2
Abbildung 2: Biosynthese zu DHT: klassischer und alternativer Weg aus Fukami et al. (26). 5	
Abbildung 3: Androstandiol zu DHT aus Penning et al. (29)	6
Abbildung 4: Enzyme des BPs aus Fukami et al. (26).....	6
Abbildung 5: Strukturformel Androsteron, Androstandiol, interner Standard	9
Abbildung 6: Prinzip der Massenspektrometrie	11
Abbildung 7: Eintuneergebnis Androstandiol und Androsteron.....	12
Abbildung 8: Übersicht Ergebnisse.....	16
Abbildung 9: Vergleich DHT-Konzentration der Kontrollen mit den 21-OHD-Patienten.....	17
Abbildung 10: Vergleich Androstandiol- und Androsteronkonzentration der Kontrollen mit den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten.....	20
Abbildung 11:Vergleich der logarithmierten Androstandiol-, Androsteron- und DHT-Konzentrationen des Kontrollkollektives und der 21-OHD-Neudiagnosen.....	22
Abbildung 12: Vergleich von Steroiden/Hormonen von 21-OHD-Patienten unter Therapie... 23	
Abbildung 13: Korrelation der Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile und Androstandiol..... 25	
Abbildung 14: Genotyp-Phänotyp-Korrelation von CYP21A2-Mutationen bei 21-OHD aus Nils Krone et al. (3).....	26
Abbildung 15: Logarithmierte Androstandiol- und Androsteronkonzentration aufgeteilt nach Schweregrad der Mutation	27
Abbildung 16: prozentualer Anteil klassischer und alternativer Weg an der DHT-Produktion	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Probanden pro Kohorte.....	10
Tabelle 2: Nachweisgrenzen der gemessenen Hormone beziehungsweise Steroide in nmol/l	14
Tabelle 3: Ergebnisse DHT.....	17
Tabelle 4: Ergebnisse Androstandiol und Androsteron, alle Altersgruppen.....	18
Tabelle 5: Vergleich von Neudiagnosen und Patienten unter Therapie.....	21
Tabelle 6: Probandinnen und Probanden pro Kohorte klinische Daten	24
Tabelle 7: Korrelationskoeffizient r der Hormone beziehungsweise Steroide aus klassischem und alternativem Weg für das männliche (a) und weibliche (b) Kontroll- und das männliche (c) und weibliche (d) 21-OHD-Kollektiv.....	28

Abkürzungsverzeichnis

Adiol	Androstandiol
ACTH	Adrenocortikotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
Asteron	Androsteron
BMI	Body-Maß-Index
BP	Backdoorpathway
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
K	Kontrollen
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
ND	Neudiagnosen 21-Hydroxylasemangel
n.a.	nicht anwendbar
P	21-Hydroxylasemangel Therapiepatienten
seP	Laborchemisch ungenügend eingestellte Therapiepatienten
Testo	Testosteron
TP	klassischer Syntheseweg über Testosteron
3 α -HSD1 und 3 (AKR1C2 und 4)	3 α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 1 und 3
3 β -HSD 2 (HSD3B2)	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2
SRD5A1	5 α -Reduktase Typ 1
11 β -OHase	11-Hydroxylase
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen
17-OHP	17 α -Hydroxyprogesteron
17-OH-DHP	17-Hydroxy-Dihydroprogesteron
21-OHD	21-Hydroxylase deficiency, 21-Hydroxylase Mangel
21-OHase	21-Hydroxylase

1. Einleitung

Die Parameter 17 α -Hydroxyprogesteron (17-OHP), Androstendion und Testosteron im Plasma beschreiben nur unzureichend die Therapieeinstellung beim Adrenogenitalen Syndrom (AGS). Insbesondere findet das hochpotente Androgen Dihydrotestosteron (DHT) bei der AGS-Diagnostik bisher kaum Berücksichtigung. Dieses kann sowohl über Testosteron (klassischer Syntheseweg) als auch über den sogenannten Backdoorpathway (BP) unter Umgehung der klassischen Androgene entstehen (Abbildung 1) (1).

1.1 Adrenogenitales Syndrom (AGS)

Bei der autosomal rezessiv vererbten Krankheit AGS handelt es sich um eine Störung der Hormonbildung in der Nebenniere, die nach verschiedenen Enzymdefekten unterschieden wird (2). 90% der AGS-Patientinnen und -Patienten leiden an einem Defekt im CYP21A2 Gen, der zu einem 21-Hydroxylasemangel (21-OHD) führt, auf welchen sich im Folgenden konzentriert wurde. Das CYP21A2 Gen kodiert in der Nebennierenrinde für das Enzym Steroid-21-Hydroxylase. Anhand der Restaktivität des Enzyms wird der 21-Hydroxylasemangel in „*salt wasting*“, „*simple virilising*“ und „*nonclassic*“ unterschieden (3).

Das Enzym sorgt dafür, dass 17-OHP zu 11-Deoxycortisol (Glukokortikoidsynthese) und Progesteron zu Desoxycorticosteron (Mineralokortikoidsynthese) konvertiert wird (Abbildung 1). Ist dieses Enzym jedoch defekt, werden Cortisol und teilweise auch Aldosteron vermindert synthetisiert. Hierbei kommt es durch den Feedback-Rückkopplungsmechanismus der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zur verstärkten Ausschüttung von Corticotropinreleasing Hormon (CRH) aus dem Hypothalamus und Adrenocortikotropen Hormon (ACTH) aus der Hypophyse. Die Folgen der damit verbundenen Überstimulation der Nebenniere sind neben einer Nebennierenhyperplasie und einer Akkumulation von 21-Desoxycortisol und 17-OHP auch eine vermehrte adrenale Androgensynthese mit verstärkter Virilisierung (4 - 6).

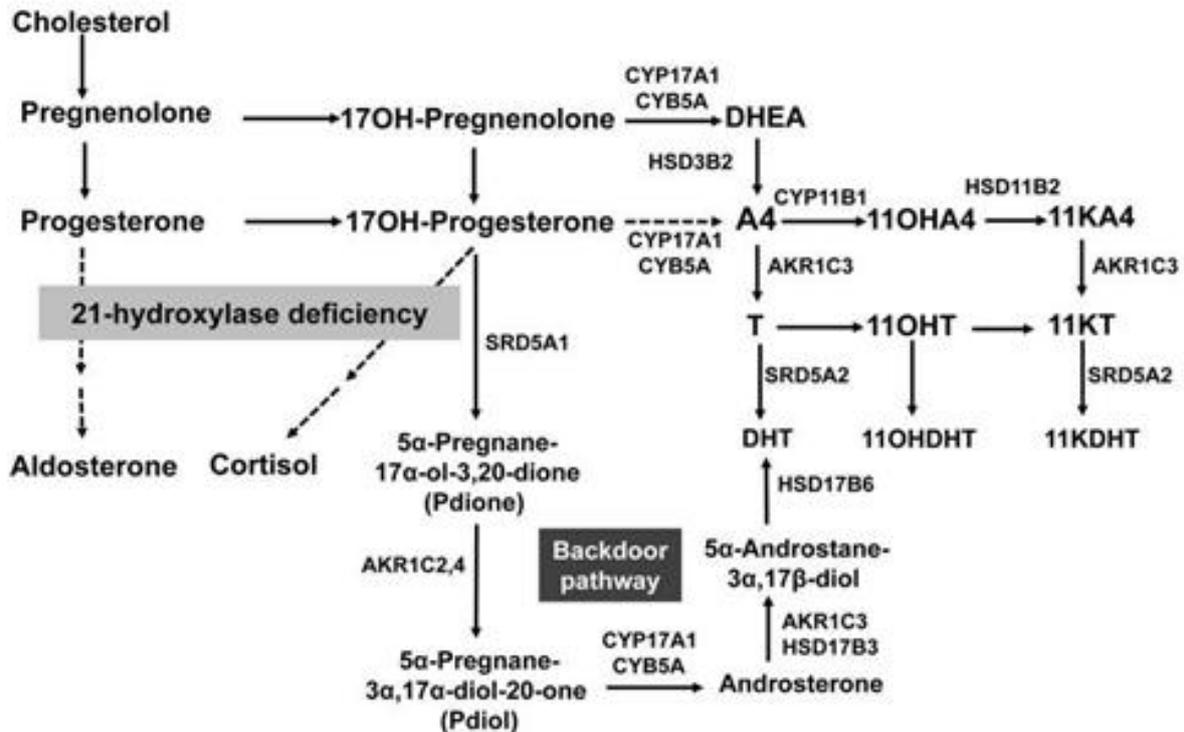


Abbildung 1: Flussdiagramm 21-OHD aus Turcu et al. (1)

Flussdiagramm der Synthesewege der Nebennierenrindenhormone Aldosteron, Cortisol und Testosteron beim 21-OHD aus Cholesterin mit der Darstellung des klassischen Weges und des BP zu DHT. Eine Produktion von Aldosteron und Cortisol ist aufgrund des 21 Hydroxylasemangels nicht möglich. Über das durch die Überstimulation der Nebennierenrinde überproduzierte 17-OH-Pregnenolon und 17-OHP kann die Synthese von Testosteron bzw. DHT über den klassischen Weg weiterhin erfolgen. Dabei kann DHT aber auch aus 17-OHP unter Umgehung des Testosterons durch den BP entstehen.

Die Symptome sind stark abhängig vom Schweregrad beziehungsweise von der Mutation der Erkrankung. Zum Beispiel kann das AGS mit oder ohne Salzverlust (einer Elektrolytentgleisung mit erhöhter Kalium- und verminderter Natrium- und Chloridkonzentration im Plasma in Verbindung mit einer metabolischen Azidose mit Trinkschwäche und Erbrechen) auftreten. Neben postnataler Gedeihstörung, Trinkschwäche, Erbrechen, Gewichtsverlust, Blutdruckerniedrigung bis hin zu Schock und Koma fallen Mädchen vor allem durch vorgeburtliche Vermännlichung (Virilisierung) des äußeren Genitals auf (5 - 7). Der Virilisierungsgrad des äußeren Genitals wird in fünf Stadien nach Prader klassifiziert (8). Das Genital von neugeborenen Jungen erscheint zunächst normal, wobei ein postnatal hyperpigmentiertes Skrotum Hinweise auf ein AGS sein kann (5 - 7). Im Verlauf kommt es durch die vermehrten Androgene zur Pseudopubertas praecox, zu Hirsutismus, zur vorzeitigen Genitalbehaarung, zum rasanten Wachstum mit vorzeitigem Wachstumsende, zu Akne, zum vorzeitigem Stimmbruch oder Amenorrhoe. Zusätzlich können durch den Mangel an Aldosteron und Cortisol weitere Symptome wie Hyponatriämie und Dehydrierung bis zum Schock hinzukommen (5, 6).

AGS-Patientinnen und -Patienten fallen in der Regel durch erhöhte 17-OHP-Werte im Rahmen des erweiterten Neugeborenen Screenings nach zwei bis drei Lebensstagen oder bei der zweiten Vorsorgeuntersuchung U2 auf (9, 10). Das nicht-klassische AGS mit bis zu 50% Restaktivität der Enzyme in der Nebennierenrinde und seltenere Enzymstörungen werden im Screening nicht sicher erkannt (10).

In der laborchemischen Blutuntersuchung weisen 17-OHP, Progesteron, Androstendion, 21-Desoxycortisol und teilweise auch Testosteron erhöhte Werte auf, woraufhin der Verdacht einer AGS-Erkrankung durch eine genetische Untersuchung bestätigt werden kann (3, 11, 6). DHT findet in der AGS-Diagnostik bisher keine Berücksichtigung. Insbesondere ist nicht bekannt, ob die Konzentration des peripher wirksamen, hochpotenten Androgens beim 21-OHD überhaupt erhöht ist.

Die Therapie besteht aus der Substitution der fehlenden Hormone durch Hydrocortison und Fluoro-Hydrocortison und damit der Durchbrechung der vermehrten ACTH-Produktion durch den negativen Feedback-Rückkopplungsmechanismus. Als laborchemisches Therapieziel wird die Normalisierung der Glukokortikoid-, Mineralokortikoid- sowie der Androgenplasmakonzentration angestrebt. Zusätzlich sollen klinisch eine Salzverlustkrise verhindert und das Wachstum sowie die Pubertät beziehungsweise die Fertilität nicht beeinträchtigt werden (5, 6).

1.2 Δ 5-Pathway

Beim klassischen Androgensyntheseweg in der Nebenniere wird aus Cholesterol über Pregnenolon durch die 17α -Hydroxylase 17-OH-Pregnenolon, welches daraufhin durch die 17,20-Lyase zu Dehydroepiandrosteron (DHEA) umgesetzt wird. Dabei ist 17-OH-Pregnenolon das Hauptsubstrat für die 17,20-Lyase (12, 13). DHEA wird durch die 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ 2 zu Androstendion verstoffwechselt, welches über 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen Typ 3 (17β -HSD3) zu Testosteron umgewandelt wird. Testosteron wird durch eine 5α -Reduktase vermittelte Reaktion zum aktiven DHT. Testosteron und DHT sind die wichtigsten bekannten natürlichen Agonisten am Androgenrezeptor. Alle anderen natürlichen Androgene wie DHEA oder Androstendion wirken indirekt durch die Umwandlung zu Testosteron oder DHT (14).

1.3 Dihydrotestosteron (DHT)

DHT entsteht im klassischen Weg als Metabolit von Testosteron, welches durch die 5α -Reduktase NADPH-abhängig zu DHT umgewandelt wird. Das Enzym 5α -

Reduktase Typ 2 ist vor allem in der Haut, der Leber, im Fettgewebe, in Blutzellen und den Ovarien beziehungsweise Hoden und der Prostata exprimiert (15, 16). Zusammen mit Testosteron und Estradiol gehört DHT zu den drei hauptsächlichen Sexualhormonen im männlichen Organismus (17). Die androgene Potenz entfaltet DHT, indem es an den intrazellulären Androgenrezeptor bindet. Aufgrund einer höheren Affinität zum Androgenrezeptor ist die androgene Potenz drei- bis zehnmal höher als die von Testosteron, obwohl die Plasmakonzentration von DHT circa 1/10 der Testosteronkonzentration beim Mann und $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{4}$ der Testosteronkonzentration bei der Frau beträgt (16, 18). Im Blut zirkulierendes DHT scheint von geringerer Bedeutung für die intrazelluläre DHT-Konzentration zu sein als die Umwandlung des zirkulierenden Testosterons (19). Mendonca et al. (20) zeigten, dass die Reduktion von Testosteron zu DHT unabdingbar für die normale fetale Entwicklung der männlichen Geschlechtsorgane (Penis, Hoden, Prostata) ist. Außerdem hat die DHT-Konzentration einen Einfluss auf die Spermienproduktion, die Ausbildung sekundärer Geschlechtsmerkmale, den Muskelaufbau und die Fettspeicher. Erniedrigte Plasmakonzentrationen führen dementsprechend unter anderem zu Hypogonadismus und verspäteter Pubertät im männlichen Organismus (16, 15). DHT-Konzentrationsbestimmung (erhöhte Plasmakonzentrationen) oder T/DHT-Verhältnisse haben heute eine Bedeutung im Therapiemonitoring der benignen Prostatahyperplasie und des Prostatakarzinoms (21) sowie in der Diagnostik des polyzystischen Ovarsyndroms (22), jedoch nicht in der AGS-Diagnostik.

1.4 Backdoorpathway (BP)

Die Originalarbeiten „*The marsupial model for male phenotypic development*“ (23) und „*5 α -androstane-3 α ,17 β -diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving 5 α -pregnane-3 α ,17 α -diol-20-one as a key intermediate*“ (24) von Wilson et al. und „*The backdoorpathway to DHT*“ (25) von Auchus zeigen mit dem BP einen neuen, alternativen Syntheseweg zu DHT unter Umgehung des klassischen Hormons Testosteron im Tammar Wallaby, einer Känguru-Art aus Australien.

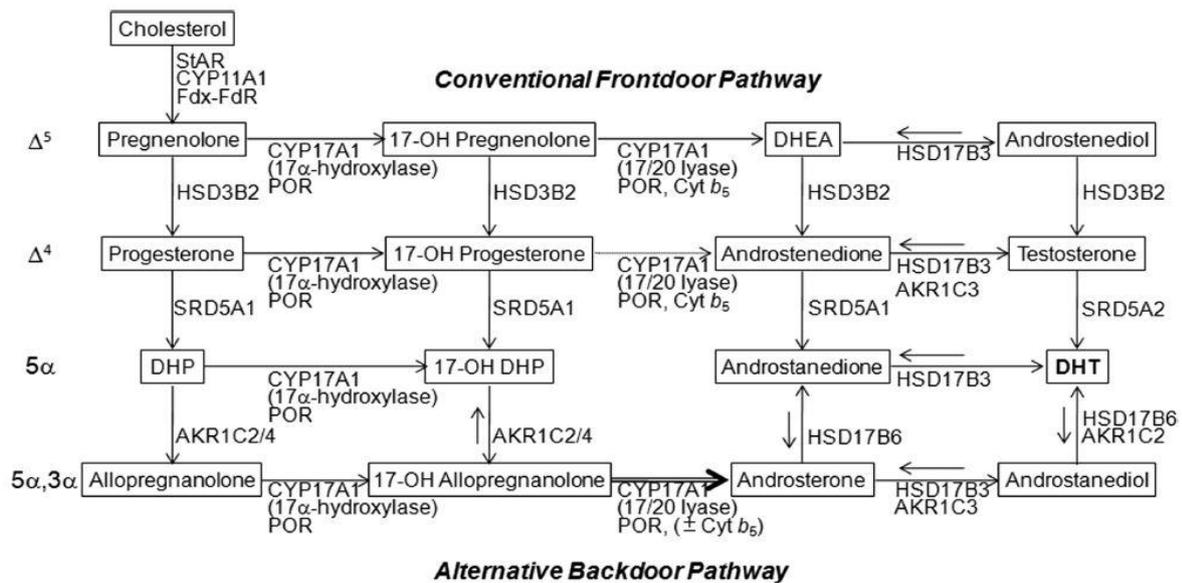


Abbildung 2: Biosynthese zu DHT: klassischer und alternativer Weg aus Fukami et al. (26)

Flussdiagramm der DHT-Biosynthese über den klassischen Weg und den BP aus Cholesterol. Die Pfeile zwischen den Hormonen beziehungsweise Steroiden zeigen die Reaktionsrichtungen und die benötigten Enzyme und Coenzyme an.

Der alternative Weg zu DHT führt, wie in Abbildung 2 (26) gezeigt, ausgehend von 17-OH-Pregnenolon durch die 3β -HSD Typ 2 (HSD3B2 Gen) zu 17α -Hydroxyprogesteron (17-OHP). 17-OHP wird von der 5α -Reduktase Typ1 (SRD5A1 Gen) zu 17α -Hydroxydihydroprogesteron (5α -Pregnane- 17α -ol-3,20-dione) und dieses wiederum durch die 3α -HSD-Typ 1 und 3 (AKR1C2/4 Gen) zu 17α -Hydroxyallopregnanolon reduziert. Im Anschluss konvertiert die $17,20$ -Lyase (CYP17A1) 17α -Hydroxyallopregnanolon zu Androsteron (27). Der nächste durch die 17β -HSD Typ3 vermittelte Schritt führt zu Androstandiol, das hauptsächlich vom Tammar Wallaby sezernierte Androgen (23). Androstandiol wird im peripheren Zielgewebe durch die 3α -HSD-Typ 3 (AKR1C2) zu DHT oxidiert (28). Die Besonderheit im Gegensatz zum Syntheseweg über Testosteron ist, dass Androstandiol nicht nur zu DHT umgewandelt, sondern DHT, wie in Abbildung 3 gezeigt, wieder zu Androstandiol reduziert werden kann. Dies impliziert, dass Androstandiol als inaktiver Speicher für nicht benötigtes, aktives DHT fungieren kann (29).

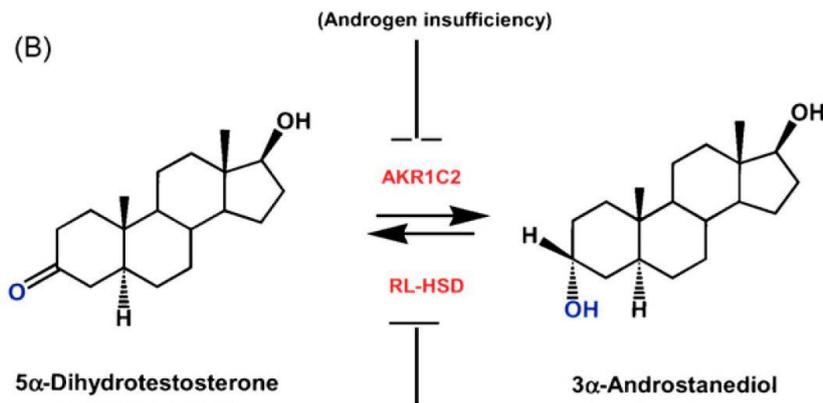


Abbildung 3: Androstandiol zu DHT aus Penning et al. (29)

Androstandiol kann sowohl zu DHT oxidiert und DHT wiederum zu Androstandiol reduziert werden.

Die menschliche Enzymausstattung (siehe Abbildung 4) kann diese alternativen Konvertierungen ebenfalls ermöglichen, sodass der BP auch eine Bedeutung im humanen DHT-Syntheseweg spielen kann (25, 26, 30). Die Gene HSD3B2, SRD5A1/2, AKR1C2/4, Cyp17A1 und HSD17B3 werden ubiquitär exprimiert und kommen vor allem in den Hoden, der Prostata, dem Uterus, den Ovarien, den Nebennieren und der Haut vor (siehe auch Anhang Expressionsdaten der BP-Steroide) (26, 31).

Enzymes		
Protein/gene	Enzyme	Short name
AKR1C2	3α-hydroxysteroid dehydrogenase type 3	3α-HSD-3
AKR1C4	3α-hydroxysteroid dehydrogenase type 1	3α-HSD-1
AKR1C3/HSD17B5	3α-hydroxysteroid dehydrogenase type 2/17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5	3α-HSD-2/17β-HSD-5
RODH/HSD17B6	Retinol dehydrogenase/17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 6	RODH/17β-HSD-6
HSD17B3	17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 3	17β-HSD-3
SRD5A1	5α-reductase type 1	5α-reductase-1
SRD5A2	5α-reductase type 2	5α-reductase-2
CYP11A1	cholesterol side chain cleavage	
CYP17A1	17α-hydroxylase, 17/20 lyase	
CYP19A1	aromatase	
CYP21A2	21-hydroxylase	21-OH
POR	cytochrome P450 oxidoreductase	

Abbildung 4: Enzyme des BPs aus Fukami et al. (26)

Die Tabelle enthält die in der DHT-Biosynthese benötigten Enzyme und Coenzyme. In der linken Spalte werden die entsprechenden Gene beziehungsweise Proteine aufgelistet. In der zweiten und dritten Spalte folgen Name und Abkürzung des jeweiligen Enzyms.

Wie Nesa Marti et al. (32) veröffentlichten, werden niedrigere Genexpressionen der BP-Steroide im Ovar im Vergleich zu den Hoden oder den Nebennieren gemessen. Flück et al. (28) untersuchten diese Steroide im Zusammenhang mit Untervirilisierung und die Bedeutung erniedrigter Werte für die fetale männliche Geschlechtsentwicklung in einem Kollektiv von 46, XY Disorders of Sexual Development (DSD)-Patienten. Humane Feten mit einer Mutation im Enzym 3α-Hydroxysteroid-

Dehydrogenase Typ 3 (3α -HSD-3; Gen AKR1C2), welches im alternativen Pfad 17-Hydroxy-Dihydroprogesteron (17-OH-DHP) zu 17-Hydroxy-Allopregnanolon reduziert und Androstandiol zu DHT oxidiert, leiden an verminderter sexueller Differenzierung beziehungsweise untervirilisierten äußeren Geschlechtsmerkmalen und das, obwohl DHT auch durch den klassischen Weg über Testosteron hergestellt werden kann. Dies lässt den Schluss zu, dass bei den betroffenen Patienten die Funktion des DHT aus dem alternativen Weg als Hormon fehlt, der BP eine Rolle in der normalen, vor allem fetalen, Geschlechtsentwicklung spielen könnte und die Aktivität des Gens AKR1C2 bedeutend zu sein scheint (26, 28). Darüber hinaus sind die Expressionen der Gene SRD5A1 und AKR1C2 in den fetalen Hoden im Vergleich zu Erwachsenen signifikant erhöht, AKR1C2 ist zusätzlich signifikant erhöht in der fetalen im Vergleich zur adulten Nebenniere (33, 28).

Eine Überproduktion im BP scheint auch eine Beteiligung an der Entstehung von Erkrankungen mit erhöhten Androgenen, zum Beispiel dem AGS, zu haben. Christakoudi et al. (7) gehen davon aus, dass bei Patientinnen und Patienten mit AGS eine Überproduktion der BP-Steroide in utero zur Induktion fetaler von 5α -Reduktase abhängiger Stoffwechselwege führt. Außerdem haben Kamrath et al. (30) die BP-Steroide im Urin mittels Massenspektrometrie gemessen und dabei erhöhte Werte beim 21-OHD diskutiert.

1.5 Adrenogenitales Syndrom und der Backdoorpathway

Beim Tammar Wallaby ist CYP17A1 für den $\Delta 5$ -Pathway nicht exprimiert. Die Synthese des DHTs verläuft hier also hauptsächlich über den BP aus 17-OHP (26). Beim Krankheitsbild des 21-OHD wird der $\Delta 5$ -Pathway zwar bestritten, allerdings führt es aufgrund der ACTH-Überproduktion zur Erhöhung von 17-OHP. Da 17-OHP ein besseres Substrat der 5α -Reduktase als Testosteron (34) und 17-OH-Allopregnanolon ein besseres Substrat für die 17,20-Lyasereaktion der CYP17A1 als 17-OHP ist (35), kann das akkumulierte 17-OHP bei 21-OHD-Patientinnen und -Patienten wie beim Tammar Wallaby über den alternativen Weg zusätzlich zur Synthese über den klassischen Weg zu DHT umgebaut werden (27) und könnte damit pathophysiologisch zum Krankheitsbild des AGS, insbesondere zum Ausmaß der Virilisierung, beitragen.

1.6 Fragestellung

Der Phänotyp des 21-OHD wird geprägt von einer vermehrten Androgensynthese. DHT ist dabei sowohl das Endprodukt des klassischen als auch des BP. Zunächst

galt es zu klären, ob 21-OHD-Patientinnen und -Patienten neben erhöhten Werten von 17-OHP, Progesteron, Androstendion, 21-Desoxycortisol und teilweise Testosteron überhaupt erhöhte DHT-Werte im Plasma aufweisen.

Da die menschliche Enzymausstattung alle dem BP zugeordneten Aktivitäten besitzt, stellte sich die Frage, ob sich die Steroide des BPs neben dem Urin (30) auch im Serum beziehungsweise Plasma eines Kontrollkollektives nachweisen lassen. Da hierfür aktuell keine etablierte Methode existiert, war ein Teilziel dieser Arbeit eine neue LC-MS/MS basierte Methode zur parallelen Bestimmung von Androstan-
diol und Androsteron zu entwickeln.

Des Weiteren sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die BP-Steroidkonzentrationen im Plasma beim 21-OHD- im Vergleich zum Kontrollkollektiv erhöht sind und somit zu erhöhten Androgenen, insbesondere zu eventuell erhöhtem DHT, beitragen können. Abschließend galt es, die Frage zu beantworten, ob BP-Steroide mit klinischen Parametern sowie anderen Hormonen der Androgensynthese korrelieren.

2. Material und Methodik

Im Folgenden werden die Steroide Androsteron (5 α -Androstan-3 α -ol-17-one beziehungsweise 3 α -Hydroxy-5 α -androstan-17-one) und Androstandiol (5 α -Androstan-3 β -17 β -diol beziehungsweise 3 β ,17 β -Dihydroxy-5 α -androstane) analysiert. Es handelt sich um eine retrospektive Untersuchung mittels Massenspektrometrie.

Androsteron hat ein Molekulargewicht von 290,44 g/mol, Androstandiol wiegt 292,46 g/mol. Beide Steroide sind im Handel verfügbar und weisen eine gute Stabilität für die Messung im Plasma auf. Als interner Standard wird ein fünffach deuteriertes Androstandiol (5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol-2,2,3,4,4-d₅) verwendet, bei dem fünf H-Atome durch fünf Deuterium-Atome ersetzt wurden und das Molekül somit um 5 g/mol schwerer ist.

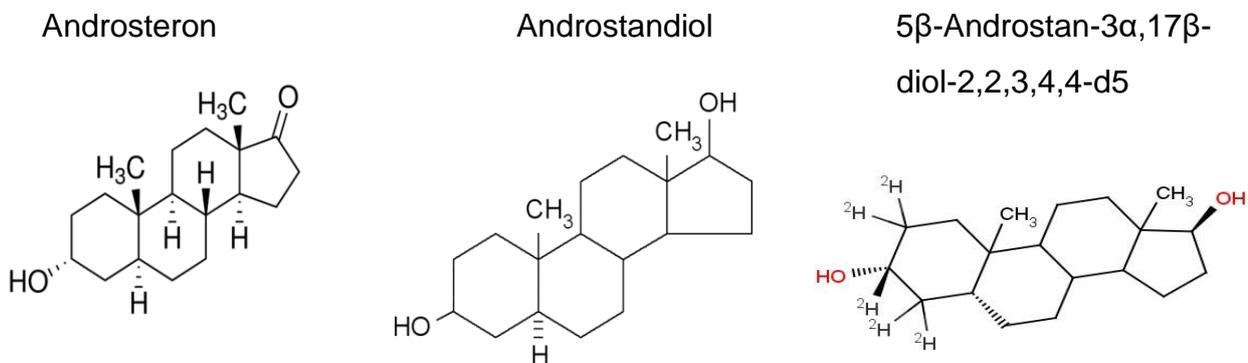


Abbildung 5: Strukturformel Androsteron, Androstandiol, interner Standard

2.1 Patienten

Laut Ethikkommission-Schreiben vom 20.09.2016 (siehe Anhang) bestehen keine berufsethischen oder berufsrechtlichen Bedenken gegen die Untersuchung der Steroidbiosynthese per Massenspektrometrie aus Restmaterial ehemals diagnostischer Proben des Kinderendokrिनologischen Labors einschließlich biometrischer Auswertung bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen (AZ D 531/16). Nach Abfrage der Daten wurden diese für den weiteren Verlauf anonymisiert.

Es wurden 105 Proben (männlich: N= 62, weiblich: N= 43) der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I, Bereich Pädiatrische Endokrinologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH), Campus Kiel mit nicht bestätigtem Verdacht auf Kleinwuchs als Kontrollgruppe festgelegt und retrospektiv aus Restmaterial gemessen. Die Patientinnen und Patienten des Kontrollkollektivs (36) mussten IGF1-Werte größer der 25. Perzentile und einen Testosteronwert im Referenzbereich aufweisen (37). Das Alter der Jungen beträgt wenige Tage bis achtzehn Jahre und bei den Mädchen

wenige Tage bis zwanzig Jahre. Die Kontrollproben wurden aus den Jahren 2013 bis 2015 zusammengestellt.

Das 21-OHD-Kollektiv umfasst 17 Serum-/Plasmaproben von 6 Jungen und 11 Mädchen jünger als vier Wochen mit erstmals diagnostiziertem AGS durch 21-Hydroxylasemangel (late onset-AGS ausgenommen) und AGS-Patientinnen und -Patienten infolge eines 21-OHDs unter Therapie mit je ein bis sechs Serum-/ Plasmaproben zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten, sodass insgesamt 101 Therapiezeitpunktproben (männlich: N= 65 Therapiezeitpunktproben, weiblich: N= 36 Therapiezeitpunktproben) gemessen werden konnten. Das Alter der Jungen unter Therapie beträgt wenige Tage bis 19 Jahre und bei den Mädchen ein Jahr bis 17 Jahre. Die Proben wurden zwischen den Jahren 2009 bis 2014 gesammelt und bei -20°C gelagert. 34 Patientinnen und Patienten (männlich: N= 19, weiblich: N= 15) fielen in diesem Therapiekollektiv mit Konzentrationen für Androstendion und 17-OHP-Werte über dem altersentsprechenden Normwert trotz Therapie auf (unzureichend kontrollierte Hyperandrogenämie) und wurden somit als laborchemisch ungenügend eingestellte Patientinnen und Patienten definiert.

Tabelle 1: Probanden pro Kohorte

Anzahl	Jungen	Mädchen	Summe
Kontrollen (K)	62	43	105
Neudiagnosen (ND) 21-OHD	6	11	17
21-OHD Patienten unter Therapie (P)	65	36	101
Davon ungenügend eingestellte (seP)	19	15	

Zusätzlich zu den Serumproben wurden ebenfalls Urinproben von zwölf Therapiepatientinnen und -patienten (acht Jungen und vier Mädchen) an ihren zur Verfügung stehenden Therapiezeitpunkten untersucht, sodass 28 Urinproben gemessen werden konnten.

2.2 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (38, 39) ist ein technisches Verfahren zur Analyse der Masse von Molekülen und Atomen. Die Methode liefert aufgrund der chemischen

Bestandteile, der Masse und des Fragmentierungsmusters der Probe Informationen sowohl über die qualitative als auch quantitative Zusammensetzung einer Probe.

Zur Analyse wurde ein Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Massenspektrometer (UPLC-MS/MS) Quattro Premier XE triple quadrupole von Waters genutzt (11). Wie in Abbildung 6 gezeigt, besteht das Gerät aus einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Analysator (Quadropol) und einem Detektor.

Dem Einlasssystem ist eine Flüssig-Chromatographie-Einheit vorgeschaltet. Hier erfolgt die Trennung der Analyten durch die unterschiedliche Affinität und Verteilung zwischen einer mobilen und stationären Phase (38). Zur Ionisation der Probe wird eine Elektrosprayionisation (ESI-Probe) verwendet, wodurch positiv geladene Mikrotröpfchen für die Analyse im Quadropol zur Verfügung stehen.

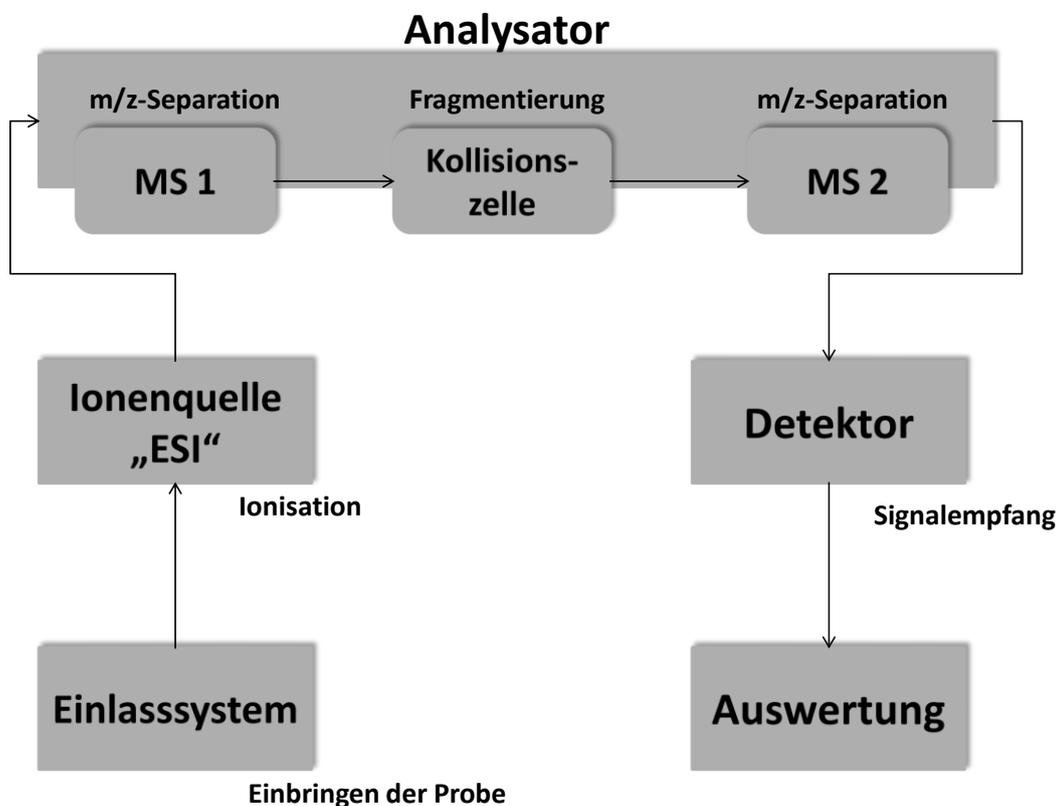


Abbildung 6: Prinzip der Massenspektrometrie

Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines Massenspektrometers. Dem Einlasssystem folgt eine Ionenquelle, daraufhin ein Analysator aus zwei Masse-zu-Ladungsseparationen und einer Kollisionszelle und schlussendlich ein Detektor. Die detektierten Signale werden anschließend mit einem Computerprogramm ausgewertet.

Im Quadropol wird zunächst das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z -Separation) des Muttermoleküls vor der Fragmentierung analysiert. Das Muttermolekül wird daraufhin mit Argon in der Kollisionszelle beschossen und zerfällt in ein für das Molekül typisches Fragmentierungsmuster. Anschließend wird nun das Masse-

zu-Ladungsverhältnis der Fragmente untersucht (38). Als Detektor dient ein Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier).

2.2.1 Eintunen

Um eine neue Methode zu etablieren, müssen die Fragmentierungsmuster der Substanzen bestimmt werden. Für die Steroide Androstandiol, Androsteron und den internen Standard (5β -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol- $2,2,3,4,4-d_5$) wurden im Rahmen der Doktorarbeit jeweils zwei Massenübergänge beobachtet. Als Massenübergang ist in diesem Zusammenhang der Zerfall des Ausgangsmoleküls mit einer bestimmten Masse in seine Fragmente mit einer geringeren Masse zu verstehen. Für Androstandiol waren das die Übergänge 275 g/mol zu 257 g/mol und 275 g/mol zu 120 g/mol und für Androsteron die Übergänge 291 g/mol zu 255 g/mol und 291 g/mol zu 273 g/mol.

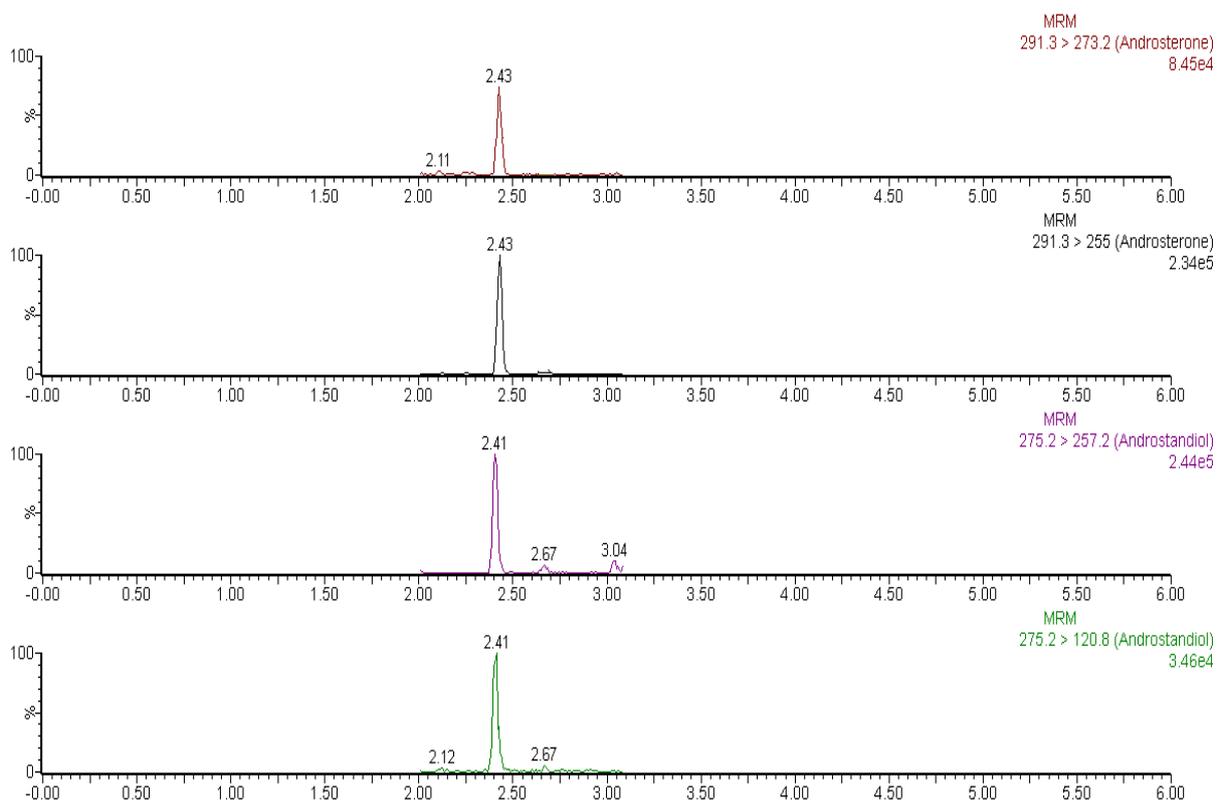


Abbildung 7: Eintuneergebnis Androstandiol und Androsteron

Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Peaks der Fragmente für Androstandiol für die Massenübergänge 275 g/mol zu 257 g/mol und zu 120 g/mol und für Androsteron für die Massenübergänge 291 g/mol zu 273 g/mol und zu 255 g/mol. Die Y-Achse ist auf den höchsten Peak in Prozent normiert. Auf der X-Achse ist die Zeit dargestellt. Zu sehen sind jeweils die Molekülmasse der entsprechenden Fragmente beziehungsweise Massenübergänge zu einer bestimmten Zeit.

2.2.2 Auswertung

Die Auswertung der Daten fand mit der MassLynx 4.1 Software und die Quantifizierung mit der TargetLynx Software (Waters, Milford, MA) statt.

2.3 Probenverarbeitung

Die Methoden zur Analyse von Androstandiol und Androsteron aus dem Plasma wurde am Beispiel einer Methode zur Messung von Steroiden des Kinderendokrinologischen Labors der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin I des UKSH, Campus Kiel im Rahmen dieser Doktorarbeit eigenständig entwickelt und durchgeführt (11, 36). Es wurde eine Standardkurve der Konzentrationen 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 5 nmol/l, 10 nmol/l, 50 nmol/l, 100 nmol/l und 200 nmol/l für Androstandiol und Androsteron mitgeführt.

Für die Methode wurden 100 µl Plasma beziehungsweise Standard (1:10 mit Stripp-Plasma verdünnt) benötigt. Die Probe beziehungsweise der Standard wurde mit 10 µl fünffach deuteriertem Standard (5β -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol-2,2,3,4,4-d₅) und 100 µl 5% Phosphorsäure gemischt und fünf Minuten bei 14.000 Umdrehungen zentrifugiert. Zur Festphasenextraktion (solid phase extraction (SPE)) der Hormone beziehungsweise der Steroide wurde eine MAX-Elutionsplatte (Waters Corporation, Milford, MA, USA) an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Die Säulen der Elutionsplatte wurden mit 200 µl Methanol konditioniert und anschließend mit 200 µl Wasser equilibriert. Daraufhin wurde die Platte mit der vorbereiteten Probe beladen. Es folgten zwei Waschschriffe zunächst mit 200 µl 5% Ammoniak in Wasser und danach mit 200 µl 10% Methanol. Die Elution wurde zweimal mit 30 µl Isopropanol vollzogen. Zu den eluierten Proben wurde direkt, nicht mehr über die Säule, 200 µl Wasser gegeben, woraufhin die Platte verschweißt wurde. Im Anschluss wurde die Platte in den Plattenschacht des Massenspektrometers gestellt und die enthaltenen Proben konnten gemessen werden. Die Probenvorbereitung ist somit schnell durchzuführen und benötigt nur ein geringes Probenvolumen. Parallel dazu wurden die Steroidkonzentrationen für DHT, Testosteron, Androstendion, 17-OHP, Cortison und 21-Desoxycortison massenspektrometrisch in den Proben mit bestimmt (11, 36).

2.4 Intra- und Interassayvarianz

Durch die Messung von zehn Standardproben in abnehmenden Konzentrationsbereichen wurde die Präzision in Form von einer Intraassayvarianz innerhalb eines Laufes und Interassayvarianz in verschiedenen Läufen sowie die Nachweisgrenzen für die einzelnen Hormone vom kinderendokrinologischen Forschungslabor durch die MTA Frau Tanja Stampe anhand der entwickelten Methode bestimmt. Die Werte sind im Anhang unter 7.1. dargestellt.

Tabelle 2: Nachweisgrenzen der gemessenen Hormone beziehungsweise Steroide in nmol/l

Nachweisgrenzen	DHEA	17-OHP	Androstendion	Testosteron	DHT	Androstandiol	Androsteron
nmol/l	0,0442	0,0188	0,03821	0,02042	0,0104	0,12193	0,06089

2.5 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung und die Entwicklung der graphischen Darstellungen erfolgten durch das Programm „R“ (40) und Microsoft Excel 2007. Enthaltene Flussdiagramme wurden mit Microsoft Power Point 2007 erstellt.

Signifikanzen wurden anhand eines t-Testes und Korrelationen mit dem Pearson Koeffizienten r ermittelt. Das statistische Signifikanzniveau wurde dabei auf kleiner 0,05 festgelegt. Dabei sind p -Werte kleiner 0,05 schwach, kleiner 0,005 mittel und kleiner 0,0005 stark signifikant. Beim Korrelationskoeffizient r gilt, dass bei Werten größer 0,1 ein geringer, bei Werten größer 0,3 ein mittlerer und bei Werten größer 0,5 ein hoher Zusammenhang besteht (41). Zeigt der p -Wert der Korrelation ein Signifikanzniveau kleiner 0,05, ist davon auszugehen, dass der Zusammenhang nicht zufällig ist.

3. Ergebnisse

Erste Messungen zeigten, dass die Steroide des BPs sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Neudiagnosen- und Therapieproben von Patientinnen und Patienten mit 21-OHD im Serum/Plasma mit der neuen Methode messbar waren. Neben Androstadiol und Androsteron wurden parallel DHT, Testosteron, Androstendion, 17-OHP, Cortison und 21-Desoxycortisol mit bestimmt. Abbildung 8 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Hormone nach Mädchen und Jungen getrennt für die Kontrollen, die Neudiagnosen und die Therapiepatientinnen und -patienten in Folge eines 21-OHDs. Zusätzlich werden die Proben in Abbildung 8 bezüglich ihres Alters in präpubertäre (Mädchen vor dem achten Lebensjahr, Jungen vor dem neunten Lebensjahr) und pubertäre Proben (Mädchen nach dem achten Lebensjahr, Jungen nach dem neunten Lebensjahr) unterteilt und separat betrachtet. Die Steroid- beziehungsweise Hormonkonzentrationswerte werden in Abbildung 8, 11, 12 und 15 mit ihren logarithmierten Werten dargestellt, weil sich die stark unterschiedlichen Zahlen so übersichtlicher vergleichen lassen, da der Logarithmus für große Zahlen viel langsamer steigt als die Zahl selbst.

Im Folgenden werden die Messergebnisse als Boxplot dargestellt und daraufhin Korrelationen zwischen den BP-Steroiden und klinischen Daten sowie anderen Hormonen überprüft. Dabei wurden alle Messungen mit einbezogen. Die Maßeinheit ist nmol/l. Werte unterhalb der Nachweisgrenze flossen mit 0,01 nmol/l in die Analyse mit ein.

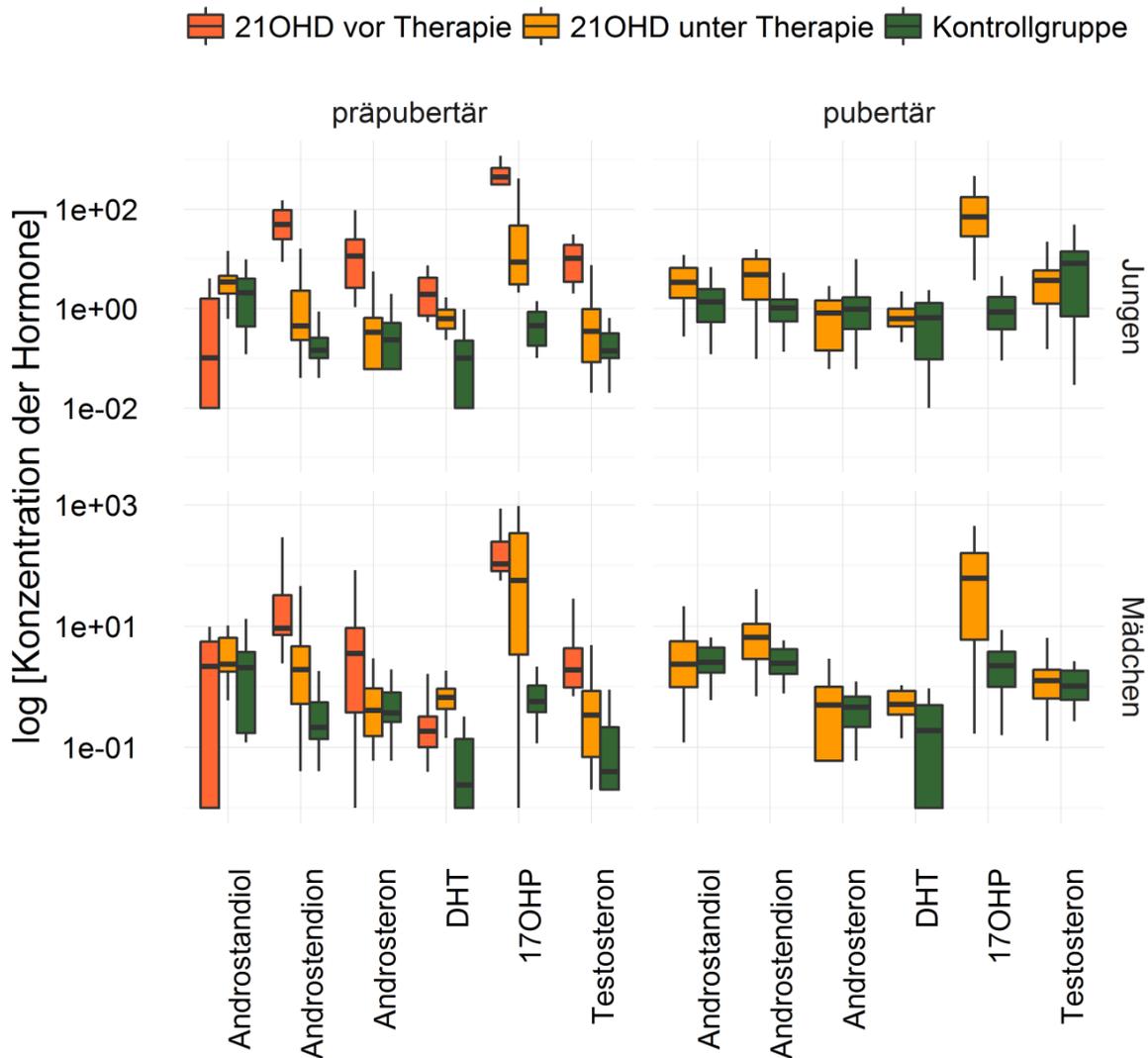


Abbildung 8: Übersicht Ergebnisse

Hormone/Steroide der verschiedenen Kohorten dargestellt auf der x-Achse mit ihren jeweiligen logarithmierten Konzentrationen auf der y-Achse der 21-OHD-Neudiagnosen (orange), der 21-OHD-Patienten unter Therapie (gelb) und der Kontrollgruppe (grün), getrennt nach Mädchen und Jungen und prä- und postpubertär als Box-Plot dargestellt. Die Mediane der Werte sind als Strich im Box-Plot dargestellt. Zwischen der oberen und unteren Begrenzung der Box befinden sich die mittleren 50% der Werte. Im Bereich der Antennen befinden sich die minimalen beziehungsweise maximalen Werte.

3.1 DHT

Zunächst sollte geprüft werden, ob 21-OHD-Patientinnen und -Patienten überhaupt erhöhte DHT-Werte im Vergleich zum Kontrollkollektiv aufweisen.

Bei 21-OHD-Patientinnen und -Patienten lassen sich sowohl für die Mädchen (p-Wert <0,0001) als auch für die Jungen (p-Wert 0,0060) signifikant höhere Plasmakonzentrationen für DHT messen als bei den Kontrollpatientinnen und -patienten. Die DHT-Plasmakonzentrationen der Mädchen sind signifikant niedriger als die der Jungen sowohl im Kontroll- (p-Wert 0,0463) als auch im 21-OHD-Kollektiv (p-Wert 0,0060).

Tabelle 3: Ergebnisse DHT

Vergleich Kontrollen und 21-OHD		DHT					
		nmol/l			p-Werte		
Kollektiv	Geschlecht	MW	Min	Max	Gesamtkollektiv	präpubertär	pubertär
Kontrollen	Jungen	0,56	0,01	2,34	0,0060	<0,0001	0,9416
21-OHD	Jungen	0,86	0,01	7,40			
Kontrollen	Mädchen	0,17	0,01	0,93	<0,0001	0,0002	0,0038
21-OHD	Mädchen	0,55	0,01	1,83			

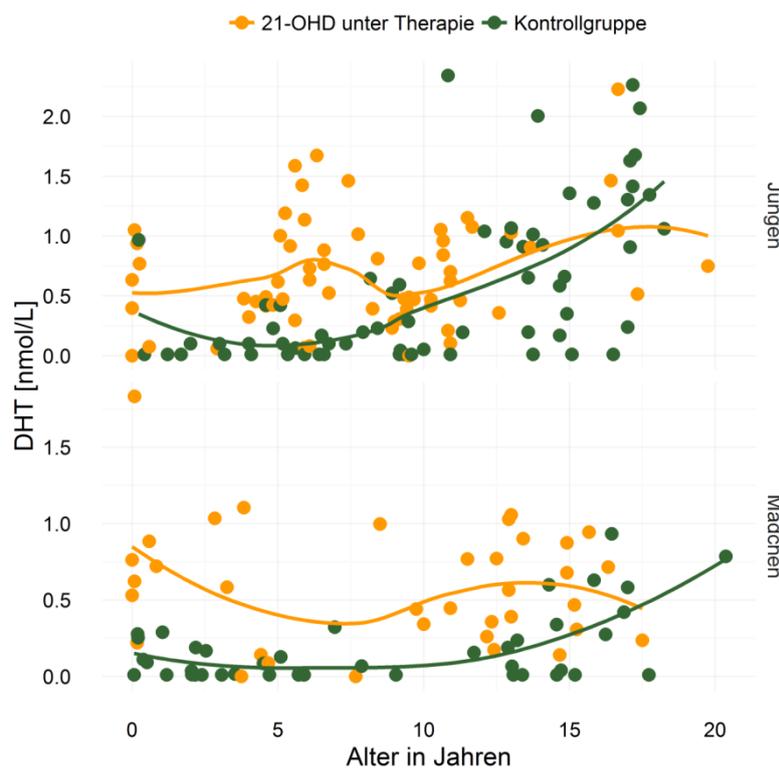


Abbildung 9: Vergleich DHT-Konzentration der Kontrollen mit den 21-OHD-Patienten

Vergleich der DHT-Konzentrationen in nmol/l (y-Achse) je nach Alter in Jahren (x-Achse) zwischen Patientinnen und Patienten der 21-OHD-Therapiegruppe (gelb) und der Kontrollgruppe (grün), für Jungen und Mädchen getrennt dargestellt. Der Mittelwert wird jeweils als Linie dargestellt.

Teilt man die Kollektive nach dem Alter in präpubertäre und pubertäre Gruppen auf, unterscheiden sich die DHT-Plasmakonzentrationen der weiblichen Kontrollen sowohl präpubertär (p-Wert 0,0002) als auch pubertär (p-Wert 0,0038) signifikant von denen der weiblichen 21-OHD-Patientinnen.

Die DHT-Plasmakonzentrationen der männlichen präpubertären 21-OHD-Patienten zeigen sich signifikant höher (p-Wert <0,0001) als die des präpubertären Kontrollkollektives. Mit Beginn der Pubertät gleichen sich die DHT-Plasmakonzentrationen der Patientengruppe an die des Kontrollkollektives an (p-Wert 0,9416).

Mit zunehmendem Alter der männlichen Kontrollprobanden steigt die DHT-Plasmakonzentration an ($r= 0,59$). Die Korrelation zwischen Alter und DHT-Plasmakonzentration verliert bei der männlichen Therapiegruppe ihren Zusammenhang.

3.2 Backdoorpathway Steroide

Der Mittelwert der Plasmakonzentration für Androstandiol beträgt altersunabhängig bei den Kontrollmädchen 2,52 nmol/l und bei den Kontrolljungen 1,83 nmol/l. Der Mittelwert der Androsteron-Plasmakonzentration ist bei den Kontrollmädchen 0,55 nmol/l und bei den Kontrolljungen 0,95 nmol/l.

Die Gesamtheit aller 21-OHD-Patientinnen und -Patienten weisen für die Androstandiol-Plasmakonzentration einen Mittelwert von 3,82 nmol/l bei den Mädchen und 3,71 nmol/l bei den Jungen und für Androsteron-Plasmakonzentration einen Mittelwert von 3,93 nmol/l bei den Mädchen und 2,82 nmol/l bei den Jungen auf (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Ergebnisse Androstandiol und Androsteron, alle Altersgruppen

Vergleich Kontrollen und 21-OHD		Androstandiol nmol/l				Androsteron nmol/l			
Kollektiv	Geschlecht	MW	Min	Max	p-Wert	MW	Min	Max	p-Wert
Kontrollen	Jungen	1,83	0,12	6,84	0,0003	0,95	0,06	4,48	0,5649
21-OHD	Jungen	3,71	0,12	14,43		2,82	0,06	96,26	
Kontrollen	Mädchen	2,52	0,12	13,07	0,3019	0,55	0,06	1,92	0,6457
21-OHD	Mädchen	3,82	0,12	21,31		3,93	0,01	83,18	

3.2.1 Geschlechtsunterschied

Vergleicht man die Jungen- mit der jeweiligen Mädchenkohorte, gibt es keine signifikanten Unterschiede für Androstandiol (Kontrollen: p-Wert 0,1508, 21-OHD: p-Wert 0,5765) oder Androsteron (Kontrollen: p-Wert 0,3591, 21-OHD: p-Wert 0,81), weder insgesamt noch in der Aufteilung in die einzelnen Alters- und Patientinnen- und Patientengruppen.

3.2.2 Vergleich der Kontrollkohorte mit der 21-Hydroxylasemangel-Kohorte (21-OHD)

Wie in Tabelle 4 und in der Abbildung 10 dargestellt, unterscheiden sich die Androstandiol-Plasmakonzentrationen der männlichen Kontrollproben von denen der männlichen 21-OHD-Proben signifikant (p-Wert 0,0003) voneinander. Die Androstandiol-Plasmakonzentrationen der männlichen 21-OHD-Patienten sind signifikant höher als die des männlichen Kontrollkollektivs. Bei den Mädchen ergibt sich kein signifikanter Unterschied der Androstandiol-Plasmakonzentrationen der weiblichen Kontrollproben verglichen mit den weiblichen 21-OHD-Proben (p-Wert 0,3019).

Die Plasmakonzentrationen von Androsteron sind weder bei den Jungen noch bei den Mädchen signifikant unterschiedlich zwischen dem Kontroll- und dem 21-OHD-Kollektiv.

Bei keinem Kollektiv gibt es eine Korrelation zwischen dem Alter und den BP-Steroiden. Das Alter korreliert bei den Kontrollen allerdings signifikant mit den Hormonen des klassischen Weges DHT (männlich: $r = 0,59$; weiblich: $r = 0,49$), Testosteron (männlich: $r = 0,51$; weiblich: $r = 0,76$), Androstendion (männlich: $r = 0,63$; weiblich: $r = 0,79$) und 17-OHP (männlich: $r = 0,53$; weiblich: $r = 0,51$). Das heißt, dass die Hormonkonzentrationen mit dem Alter ansteigen.

Im Therapiekollektiv ist diese Altersabhängigkeit der genannten Hormone sowohl bei den Mädchen als auch bei den Jungen nicht mehr nachweisbar.

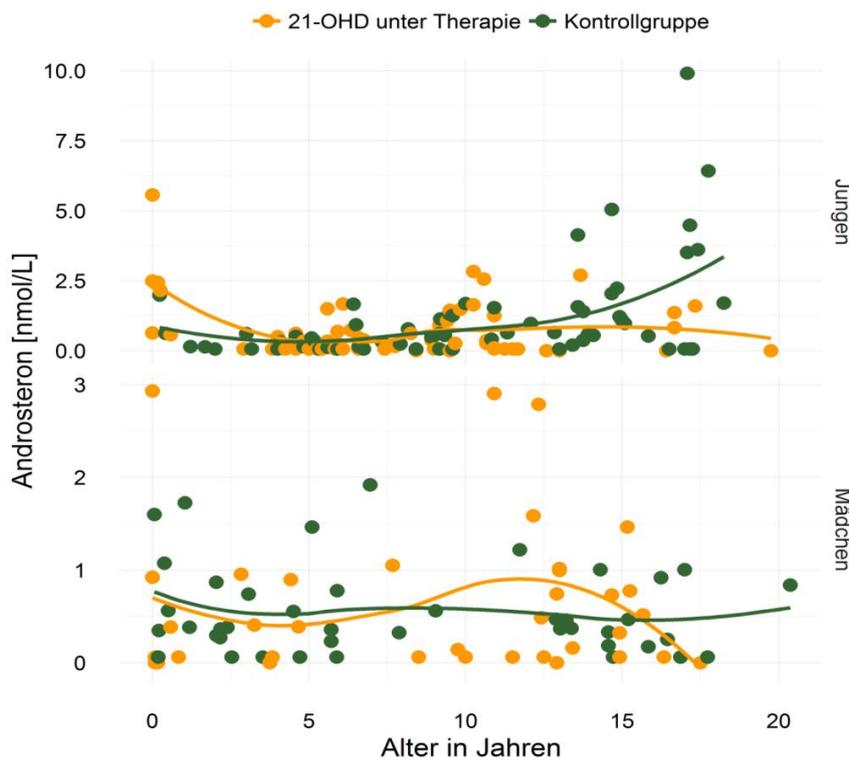
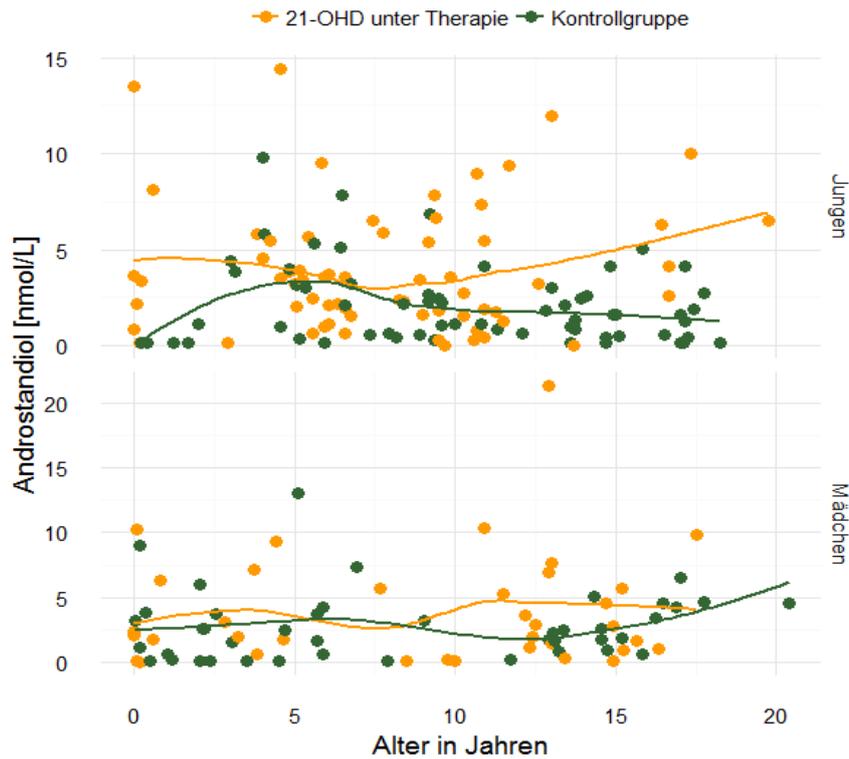


Abbildung 10: Vergleich Androstendiol- und Androsteronkonzentration der Kontrollen mit den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten

Vergleich der Androstendiol- und Androsteron-Konzentration in nmol/l (y-Achse) je nach Alter in Jahren (x-Achse) zwischen Patientinnen und Patienten der 21-OHD-Therapiegruppe (gelb) und der Kontrollgruppe (grün), für Jungen und Mädchen getrennt dargestellt. Der Mittelwert wird jeweils als Linie im Punktdiagramm dargestellt.

3.2.3 Vergleich von Neudiagnosen und Kontrollpatientinnen und -patienten beziehungsweise 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie

In Abbildung 11 sind die Plasmakonzentrationen der Steroide Androstandiol und Androsteron sowie des Hormons DHT für die Kontrollen und die Patientinnen und Patienten mit erstmals diagnostiziertem AGS durch 21-Hydroxylasemangel aufgetragen. Für eine bessere Übersichtlichkeit wurden die logarithmierten Werte verwendet.

Vergleicht man die Patientinnen und Patienten mit neudiagnostiziertem 21-OHD mit den Kontrollen wie in Abbildung 11, fallen neben den schon unter 3.1 beschriebenen signifikant erhöhten DHT-Plasmakonzentrationen ebenfalls die signifikant erhöhten Androsteron-Plasmakonzentrationen der Patientinnen und Patienten mit 21-OHD Neudiagnose auf (p-Wert 0,0027). Die Androstandiol-Plasmakonzentrationen der 21-OHD Neudiagnosen und des Kontrollkollektives weichen dabei nicht signifikant voneinander ab (p-Wert 0,2616).

Tabelle 5: Vergleich von Neudiagnosen und Patienten unter Therapie

Neudiagnosen (ND) zu Therapiepatienten (P)	Jungen		Mädchen	
	ND	P	ND	P
Mittelwert in nmol/l	ND	P	ND	P
Androstandiol	1,22	3,94	3,20	4,00
Androsteron	25,36	0,740	14,67	0,65

Unter Therapie fallen die Mittelwerte der Androsteron-Plasmakonzentration sowohl für das weibliche als auch für das männliche Neudiagnosenkollektiv deutlich ab. Bei der Androstandiol-Plasmakonzentration steigt der Mittelwert der Neudiagnosen unter Therapie leicht an (siehe Tabelle 5).

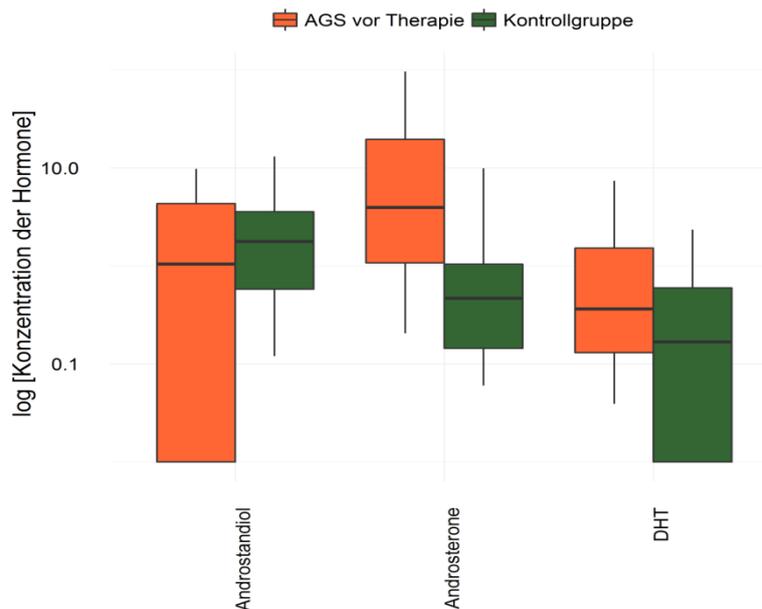


Abbildung 11: Vergleich der logarithmierten Androstandiol-, Androsteron- und DHT-Konzentrationen des Kontrollkollektives und der 21-OHD-Neudiagnosen

Vergleich der logarithmierten Androstandiol-, Androsteron- und DHT-Konzentration auf der y-Achse des Kontrollkollektives (grün) mit den 21-OHD-Neudiagnosen (orange) als Box-Plot dargestellt. Der Median der Werte ist als Strich im Box-Plot dargestellt. Zwischen der oberen und unteren Begrenzung der Box befinden sich die mittleren 50% der Werte. Im Bereich der Antennen befinden sich die minimalen beziehungsweise maximalen Werte.

3.2.4 Vergleich von gut und laborchemisch ungenügend eingestellten 21-OHD-Patientinnen und -Patienten

Es muss einen signifikanten Unterschied zwischen gut und laborchemisch ungenügend eingestellten (unzureichend kontrollierte Hyperandrogenämie) Therapiepatientinnen und -patienten geben, damit sich die Messung der BP-Steroide als potentieller Verlaufparameter eignet.

Bei den Therapiepatientinnen und -patienten des Kollektivs fielen 34 (19 Jungen und 15 Mädchen) Proben mit über die altersentsprechenden Normwerte erhöhten Konzentrationen für 17-OHP und Androstendion auf, die als laborchemisch ungenügend eingestellte Patientinnen und Patienten definiert wurden.

Die Abbildung 12 vergleicht dabei alle Hormone beziehungsweise Steroide der 21-OHD-Patientinnen und -Patienten mit erhöhtem 17-OHP und Androstendion und den restlichen 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie mit normalen 17-OHP-Plasmakonzentrationen prä- und postpubertär nach Geschlechtern getrennt.

Für die Mädchen und die Jungen insgesamt ergeben sich unabhängig vom Alter signifikant höhere Androstandiol-Plasmakonzentration zwischen den schlecht eingestellten und den restlichen 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie (p-Wert 0,0137). Ebenso zeigt sich eine signifikante Abweichung zwischen den schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten und den Kontrollen (p-Wert <0,0001).

Neben Androstadiol sind insgesamt altersunabhängig auch die Werte für DHT im Kollektiv der Patientinnen und Patienten mit erhöhten 17-OHP-Plasmakonzentrationen im Vergleich zum restlichen Patientenkollektiv unter Therapie nochmals erhöht (p-Wert 0,01806).

Für Androsteron lässt sich keine signifikante Differenz zwischen den Kontrollpatientinnen und -patienten oder den gut und den schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten feststellen (p-Wert 0,8135).

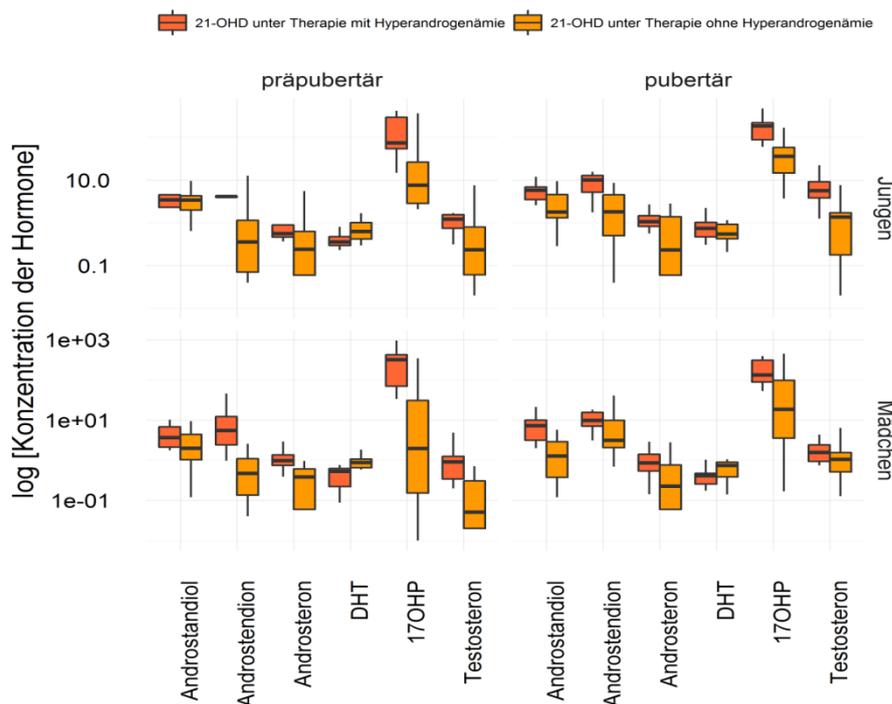


Abbildung 12: Vergleich von Steroiden/Hormonen von 21-OHD-Patienten unter Therapie

Vergleich zwischen den logarithmierten Steroid- beziehungsweise Hormonkonzentrationen auf der y-Achse von 21-OHD-Patientinnen und -patienten mit normwertigem 17-OHP- und Androstendion-Konzentrationen unter Therapie (gelb) und erhöhten 17-OHP- und Androstendion-Konzentrationen trotz Therapie (orange) getrennt nach Geschlecht und prä- und postpubertär als Box-Plot dargestellt. Der Median der Werte ist als Strich im Box-Plot dargestellt. Zwischen der oberen und unteren Begrenzung der Box befinden sich die mittleren 50% der Werte. Im Bereich der Antennen befinden sich die minimalen beziehungsweise maximalen Werte.

3.2.5 Urin

Auch im Urin sind die beiden BP-Steroide mit der entwickelten Methode detektierbar. Es wurden insgesamt 28 Urinproben von Patientinnen und Patienten mit 21-OHD unter Therapie zusammen mit ihren entsprechenden Blutproben analysiert. Im Unterschied zu der Serummethode wurden ein interner Standard für Urinmessungen (17-OHP D8) und eine WAX Platte von Waters verwendet. Ansonsten gestaltete sich die Probenvorbereitung und Messung gleich.

Bei den gemessenen Urinproben lassen sich keine signifikanten Unterschiede oder Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der Blutprobe und der dazugehörigen Urine für Androstandiol (p-Wert 0,0587, $r = -0,3615$) und Androsteron (p-Wert 0,9950, $r = -0,001$) feststellen.

3.3 Korrelation zwischen BP und klinischen Daten

Tabelle 6: Probandinnen und Probanden pro Kohorte klinische Daten

Klinische Daten	Neudiagnosen		unter Therapie		Kontrollen	
	Jungen	Mädchen	Jungen	Mädchen	Jungen	Mädchen
Perzentile Wachstumsgeschwindigkeit	n.a.	n.a.	22 / 65	7 / 36	0 / 62	0 / 43
Perzentile BMI	1 / 6	3 / 11	58 / 65	31 / 36	58 / 62	42 / 43
Mutationsanalytik CYP21A2	6 / 6	9 / 11	35 / 65	12 / 36	n.a.	n.a.
Knochenalter	n.a.	n.a.	10 / 65	0 / 36	0 / 62	0 / 43

Daten zu klinischen Befunden bei 21-OHD-Patientinnen und Patienten bei Erstdiagnose, 21-OHD unter Therapie sowie Kontrollen unter Berücksichtigung des Geschlechts. Angegeben ist die Anzahl der Patientinnen und Patienten, von denen Daten vorliegen (n.a. = nicht anwendbar).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe der BP-Steroidkonzentration im Plasma und ausgewählten klinischen Parametern besteht. Existiert eine Korrelation zwischen den BP-Steroiden und klinischen Parametern bei den Patientinnen und Patienten beziehungsweise Kontrollen, könnte die Messung der BP-Steroide als eine mögliche Beurteilung der Therapieeinstellung diskutiert werden.

Für die Perzentile der Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Prozent, die Body-Maß-Index (BMI)-Perzentile in Prozent und die Genetik waren ausreichend Information retrospektiv zu ermitteln.

3.3.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Das Krankheitsbild des AGS entwickelt sich je nach Schweregrad der Mutation und hat dementsprechend unterschiedliche Phänotypen. Ein schlecht eingestelltes AGS geht mit der Beschleunigung der Wachstumsgeschwindigkeit einher. Mit der Korrelation der BP-Steroide und der Perzentile der Wachstumsgeschwindigkeit soll ein Zusammenhang der selbigen untersucht werden. Dazu wurde die Perzentile der

Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Prozent mit den Androstandiol- beziehungsweise Androsteronplasmakonzentrationen in nmol/l verglichen.

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen Androstandiol oder Androsteron und der Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile (%) in allen Gruppen und Geschlechtern erhoben werden. Abbildung 13 zeigt jedoch den Trend in der Gruppe der 21-OHD-Patientinnen und -Patienten: Je höher die Androstandiolwerte sind, desto größer ist die Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile.

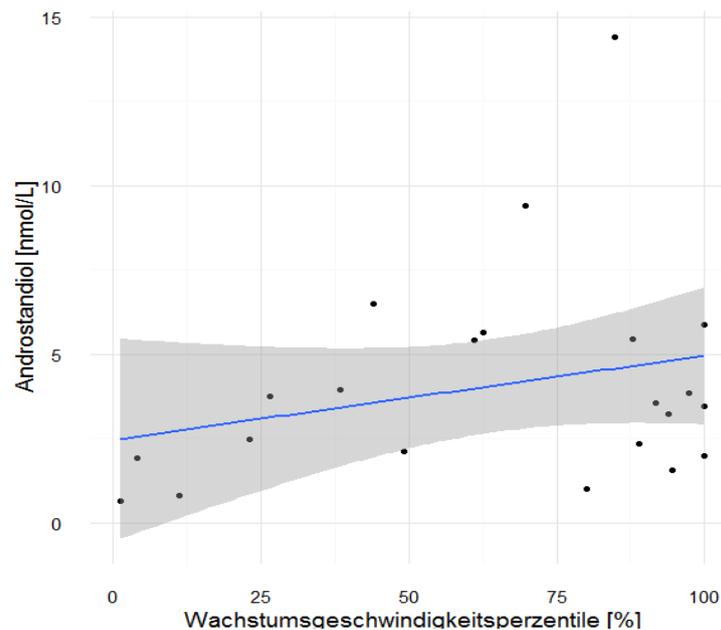


Abbildung 13: Korrelation der Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile und Androstandiol

Korrelation der Androstandiolkonzentration in nmol/l auf der y-Achse und der Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile [%] in Prozent auf der x-Achse als Punktdiagramm. Die Linie markiert den Mittelwert.

3.3.2 Body-Maß-Index (BMI)

Da Fettgewebe hormonaktiv ist, sollte untersucht werden, ob ein erhöhter BMI einen Beitrag zu erhöhten BP-Steroiden leistet. Dazu wurde die BMI-Perzentile in Prozent mit den Androstandiol- beziehungsweise Androsteronplasmakonzentrationen in nmol/l korreliert.

Die Androstandiol- und die Androsteronplasmakonzentration weisen weder beim Kontroll- noch beim 21-OHD-Kollektiv eine signifikante Korrelation mit der BMI Perzentile auf. Dies gilt sowohl für die Mädchen als auch für die Jungen.

3.3.3 CYP21A2-Genotyp

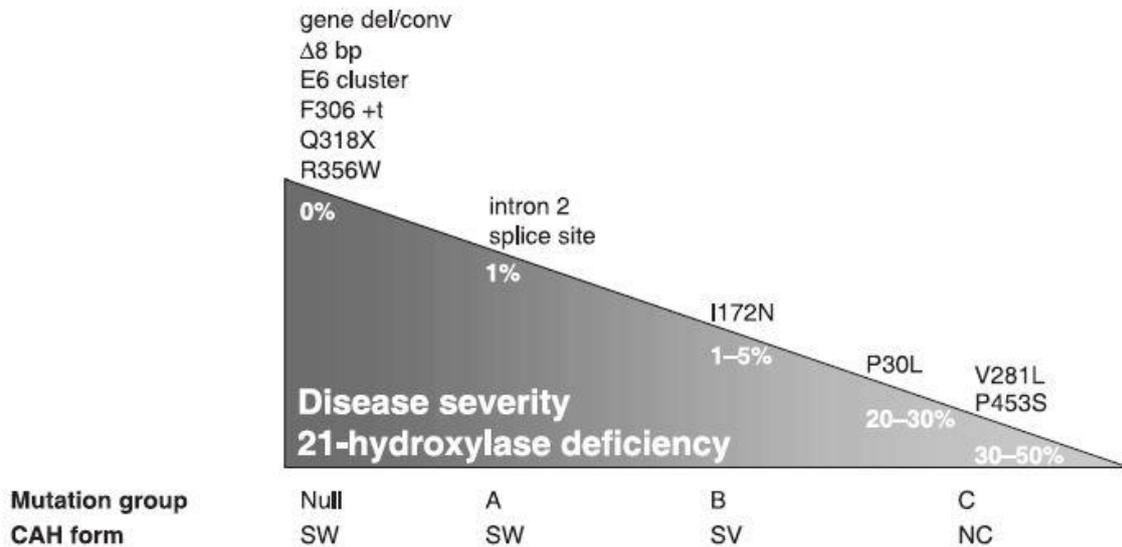


Abbildung 14: Genotyp-Phänotyp-Korrelation von CYP21A2-Mutationen bei 21-OHD aus Nils Krone et al. (3)

Einteilung der Mutationen, die zum 21-OHD führen, anhand der Restaktivität des mutierten Enzyms im Vergleich zum Wildtypenzym. Je geringer die Restaktivität ist, desto gravierender ist der Phänotyp des 21-OHD. Die Gruppen 0 und A haben eine maximale Restaktivität von 1% und präsentieren sich klinisch mit einem Salzverlust (SW = *salt wasting*). Die Gruppe B imponiert klinisch mit einer Virilisierung ohne Salzverlust und wird als „*simple virilising*“ (SV) definiert. Das nicht klassische AGS (NC = „*nonclassic*“) hat eine Restaktivität von bis zu 50% und fällt klinisch gar nicht oder erst im Verlauf des Lebens auf.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob der Schweregrad der Mutation des 21-OHD einen Einfluss auf die Höhe der BP-Steroide hat. Das heißt, ob die BP-Steroidplasmakonzentrationen ansteigen, je gravierender die Schwere der Mutation ist.

Dafür wurden die Mutationen der Patientinnen und Patienten dieser Studie, die einen 21-OHD zur Folge haben, am Beispiel von Krone et al. (2009) in Gruppen anhand ihrer Restaktivität eingeteilt (3). Die Gruppen 0 und A haben maximal 1% Restaktivität des mutierten Enzyms im Vergleich mit einem Wildtypenzym und somit neben der hohen Androgenkonzentration auch noch einen gravierenden Salzverlust zur Folge (SW = *salt wasting*, salzverlierendes AGS). Mutationen, die lediglich zur Virilisierung führen, werden in die Gruppe B (SV = *simple virilising*, einfach virilisierendes AGS) eingeteilt. Die „*nonclassic*“-Gruppe C (NC = nicht klassisches AGS) beinhaltet Mutationen mit bis zu 50% Restaktivität des mutierten Enzyms (siehe Abbildung 14).

In dieser Untersuchung wurden nur Patientinnen und Patienten mit Neudiagnosen (late onset Patienten ausgenommen) betrachtet. In Abbildung 15 wurden die logarithmierten Plasmakonzentrationen von Androstandiol und Androsteron der unterschiedlichen Mutationsgruppen aufgetragen.

Es konnte für Androstendiol weder bei den Jungen noch bei den Mädchen eine signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad der Mutation und den Androstendiolkonzentrationen nachgewiesen werden.

Bei Androsteron allerdings existiert ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Androsteronkonzentration und der Mutationsgruppe sowohl bei den Jungen (p-Wert 0,0072 und $r = -0,8648$) als auch bei den Mädchen (p-Wert 0,0105 und $r = -0,7765$). Je niedriger die Restaktivität der Nebennierenrinde ist, desto signifikant höher sind die Androsteronplasmakonzentrationen.

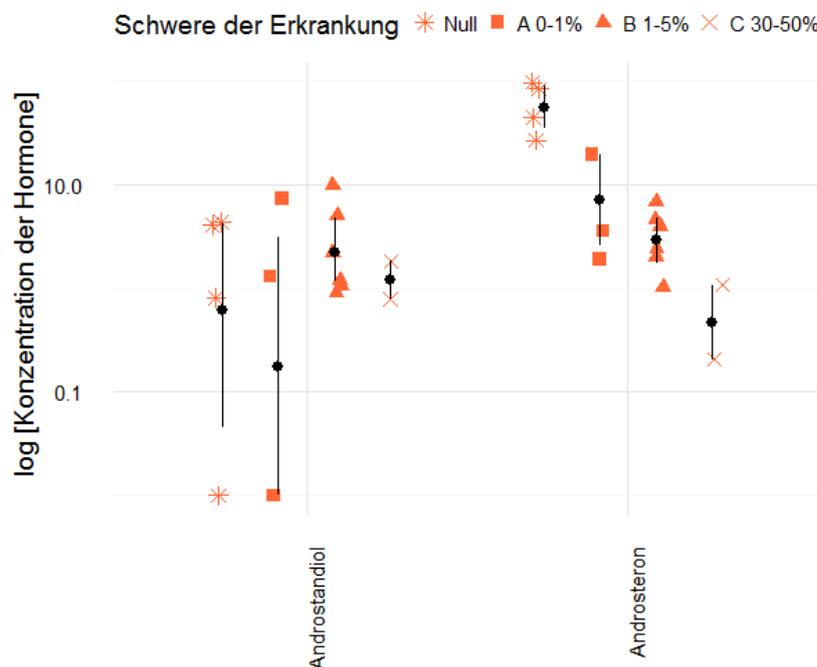


Abbildung 15: Logarithmierte Androstendiol- und Androsteronkonzentration aufgeteilt nach Schweregrad der Mutation

Vergleich der logarithmierten Androstendiol- und Androsteronkonzentration aufgeteilt nach Schweregrad der Mutation nach Nils Krone et al. „Genetics of congenital adrenal hyperplasia“ (2009) in Gruppen anhand ihrer Restaktivität eingeteilt. Die Gruppen 0 (Sternchen) und A (Kästchen) haben maximal 1% Restaktivität der Nebennierenrinde mit Salzverlust, die Gruppe B (Dreieck) zwischen 1-5% und die Gruppe C (x) zwischen 30-50% Restaktivität.

3.4 Korrelation zwischen Steroiden beziehungsweise Hormonen

Zurzeit stellt die laborchemische Bestimmung der Hormonkonzentrationen aus dem klassischen Weg eine Möglichkeit dar, die Therapieeinstellung des 21-OHD zu kontrollieren. Die parallele Untersuchung der Hormone des klassischen Weges erbrachte die für das 21-OHD typischen, signifikanten Erhöhungen von Androstendion, 17-OHP und 21-Desoxycortisol von AGS-Patientinnen und Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Anhang 7.3). Testosteron kann, muss dabei aber nicht erhöht sein (11).

Die Tabelle 7 zeigt die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Hormone des klassischen Weges und des BPs geschlechtsspezifisch im jeweiligen Kollektiv.

Tabelle 7: Korrelationskoeffizient r der Hormone beziehungsweise Steroide aus klassischem und alternativem Weg für das männliche (a) und weibliche (b) Kontroll- und das männliche (c) und weibliche (d) 21-OHD-Kollektiv

a)	<i>Jungen Kontrollkollektiv</i>					
<i>Korrelation r</i>	<i>Androstandi- ol</i>	<i>Androste- ron</i>	<i>Testosteron</i>	<i>Androstendion</i>	<i>17-OHP</i>	<i>21- Desoxycortisol</i>
Androstandi- ol	1,00	-0,02	-0,04	-0,04	-0,11	0,13
Androsteron	-0,02	1,00	0,35	0,47	0,35	0,15
DHT	-0,05	0,41	0,69	0,55	0,47	0,35
Testosteron	-0,04	0,35	1,00	0,66	0,52	0,34
Androstendion	-0,04	0,47	0,66	1,00	0,79	0,22
17-OHP	-0,11	0,35	0,52	0,79	1,00	0,26
21- Desoxycortisol	0,13	0,15	0,34	0,22	0,26	1,00
b)	<i>Mädchen Kontrollkollektiv</i>					
<i>Korrelation r</i>	<i>Andros- tandi- ol</i>	<i>Androste- ron</i>	<i>Testosteron</i>	<i>Androstendion</i>	<i>17-OHP</i>	<i>21- Desoxycortisol</i>
Androstandi- ol	1,00	0,44	0,17	0,22	0	-
Androsteron	0,44	1,00	0	0	0	-
DHT	0,31	0,15	0,61	0,75	0,54	-
Testosteron	0,17	0	1,00	0,88	0,61	-
Androstendion	0,22	0	0,88	1,00	0,73	-
17-OHP	0	0	0,61	0,73	1,00	-
c)	<i>Jungen 21-OHD-Kollektiv</i>					
<i>Korrelation r</i>	<i>Andros- tandi- ol</i>	<i>Androste- ron</i>	<i>Testosteron</i>	<i>Androstendion</i>	<i>17-OHP</i>	<i>21- Desoxycortisol</i>
Androstandi- ol	1,00	-0,16	-0,09	-0,12	0,01	0,22
Androsteron	-0,16	1,00	0,69	0,76	0,41	0,24
DHT	-0,12	0,50	0,62	0,80	0,37	0,44
Testosteron	-0,09	0,69	1,00	0,73	0,53	0,38
Androstendion	-0,12	0,76	0,73	1,00	0,72	0,59
17-OHP	0,01	0,41	0,53	0,72	1,00	0,68
21- Desoxycortisol	0,22	0,24	0,38	0,59	0,68	1,00
d)	<i>Mädchen 21-OHD-Kollektiv</i>					
<i>Korrelation r</i>	<i>Andros- tandi- ol</i>	<i>Androste- ron</i>	<i>Testosteron</i>	<i>Androstendion</i>	<i>17-OHP</i>	<i>21-Desoxycortisol</i>
Androstandi- ol	1,00	-0,01	0,00	0,00	0,32	0,15
Androsteron	-0,01	1,00	0,92	0,97	0,16	-0,02
DHT	-0,15	0,05	0,07	0,01	-0,11	-0,06
Testosteron	0,00	0,92	1,00	0,95	0,30	0,03
Androstendion	0,00	0,97	0,95	1,00	0,25	0,04
17-OHP	0,32	0,16	0,30	0,25	1,00	0,64

3.4.1 Androstandiol

Die Androstandiolplasmakonzentration korreliert weder beim Kontroll- noch beim 21-OHD-Kollektiv oder nur schwach mit den Hormonkonzentrationen von Testosteron, Androstendion, 17-OHP, 21-Desoxycortisol und DHT. Dies gilt für beide Geschlechter.

3.4.2 Androsteron

Im weiblichen Kontrollkollektiv bestehen keine Zusammenhänge zwischen der Androsteronplasmakonzentration und den Hormonen Testosteron, Androstendion, 17-OHP, 21-Desoxycortisol und DHT. Bei den männlichen Kontrollproben zeigen sich dagegen signifikante Zusammenhänge zwischen Androsteron und den Hormonen des klassischen Weges außer 21-Desoxycortisol. Je höher die Androsteronplasmakonzentrationen sind, desto höher sind auch die Konzentrationen für Testosteron, Androstendion, 17-OHP und DHT.

Die Korrelationen zwischen Androsteron und Testosteron (männlich: $r= 0,69$ und weiblich: $r= 0,92$) sowie Androsteron und Androstendion (männlich: $r= 0,76$ und weiblich: $r= 0,97$) ist bei beiden Geschlechtern im 21-OHD-Kollektiv signifikant. Je höher also die Testosteron- und Androstendionkonzentrationen sind, desto höher sind die Androsteronkonzentrationen. Bei den erkrankten Jungen kommen zusätzlich signifikant hohe Androsteronkonzentrationen neben erhöhten Konzentrationen von 17-OHP ($r= 0,41$) und DHT ($r= 0,50$) vor.

3.4.3 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP)

17-OHP korreliert bei den männlichen und weiblichen Kontrollpatientinnen und -patienten signifikant sowohl stark mit Testosteron ($r= 0,52$) als auch mit Androstendion ($r= 0,79$) und mittelstark mit DHT ($r= 0,47$), das heißt, dass die Hormonplasmakonzentration steigen, sobald die 17-OHP-Konzentration ansteigt.

Im männlichen 21-OHD Kollektiv lässt sich diese Korrelation für Testosteron ($r= 0,53$) und Androstendion ($r= 0,72$), sowie die mittelstarke für DHT ($r= 0,37$) ebenfalls nachweisen. Bei den weiblichen Therapiepatienten besteht der Zusammenhang zwischen 17-OHP und Testosteron, Androstendion beziehungsweise DHT nicht.

Zusätzlich besteht bei beiden Geschlechtern des Therapiekollektives eine Korrelation zwischen 17-OHP und 21-Desoxycortisol. Auch hier führen erhöhte 17-OHP-Konzentrationen zu erhöhten 21-Desoxycortisolkonzentrationen.

3.4.4 Testosteron/ Androstendion

Erhöhte Androstendionplasmakonzentrationen sind im Kontrollkollektiv unabhängig vom Geschlecht signifikant mit erhöhten Testosteron- ($r= 0,66$), 17-OHP- ($r= 0,79$) und DHT-Konzentrationen ($r= 0,55$) korreliert.

Eine signifikante Korrelation im männlichen 21-OHD-Kollektiv besteht mit DHT ($r= 0,80$), Testosteron ($r= 0,73$), 17-OHP ($r= 0,72$) und 21-Desoxycortisol ($r= 0,59$). Bei den weiblichen 21-OHD-Patientinnen dagegen existiert nur eine signifikante Korrelation zwischen Androstendion und Testosteron ($r= 0,55$).

Testosteron korreliert im Kontrollkollektiv geschlechtsunabhängig mit DHT ($r= 0,69$), Androstendion ($r= 0,66$) und 17-OHP ($r= 0,52$). Ähnliche Korrelationen bestehen im männlichen 21-OHD-Kollektiv.

Bei weiblichen 21-OHP-Patientinnen korrelieren nur Testosteron und Androstendion ($r= 0,95$).

3.4.5 DHT

Weder für die Jungen noch für die Mädchen des Kontrollkollektives stellt sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Androstandiol oder Androsteron und DHT ein. Das heißt, dass hohe Plasmaspiegel für Androstandiol und Androsteron nicht signifikant mit erhöhten DHT-Plasmaspiegeln einhergehen.

Bei den männlichen 21-OHD-Patienten korreliert DHT mit Androsteron ($r= 0,50$) signifikant, jedoch nicht mit Androstandiol, und auch bei den weiblichen 21-OHD-Patientinnen lässt sich keine Korrelation zwischen den BP-Steroiden und DHT messen.

Zusätzlich besteht geschlechtsunabhängig ein signifikanter Zusammenhang von DHT mit Testosteron ($r= 0,69$) und Androstendion ($r= 0,55$) im Kontrollkollektiv. Der Plasmaspiegel für DHT steigt bei erhöhten Testosteron- oder Androstendionkonzentrationen an. Die Korrelation lässt sich auch bei den männlichen 21-OHD-Patienten für Testosteron ($r= 0,62$) und Androstendion ($r= 0,80$) nachweisen. Bei den weiblichen Therapiepatientinnen lässt sich keine signifikante Korrelation eruieren.

3.5 Quotient Backdoorpathway zu klassischem Pathway

Um herauszufinden, ob der Anteil der BP-Steroide zur Entstehung von DHT beim Krankheitsbild des 21-OHD erhöht ist, wurde als Modell ein Quotient zwischen den Hormonkonzentrationen des klassischen Weges Androstendion und Testosteron so-

wie den Steroiden des alternativen Pfades Androstandiol und Androsteron verwendet, der nach dem Beispiel der Arbeit von Kamrath gebildet wurde (30).

Um einen prozentualen Anteil zu errechnen, wie viel der BP und wie viel der klassische Weg über Testosteron (TP) zur DHT-Bildung modellhaft beitragen, wurden die Einzelsummen der Konzentrationen der Pathways Androstandiol und Androsteron (BP) sowie Androstendion und Testosteron (TP) zu einer Gesamtsumme addiert. Daraufhin wurden die Einzelsummen der Konzentrationen der Hormonwege ins Verhältnis zur Gesamtsumme gesetzt:

$$\text{prozentualer Anteil (BP)} = \frac{BP}{BP + TP} * 100;$$

In Abbildung 16 ist die prozentuale Verteilung für den BP im Verhältnis zum Alter in Jahren der jeweiligen Kohorte aufgetragen. Bei allen betrachteten Gruppen existieren Patientinnen und Patienten, bei denen die Hormonproduktion rechnungsbedingt hauptsächlich über einen der beiden Wege beigesteuert wird.

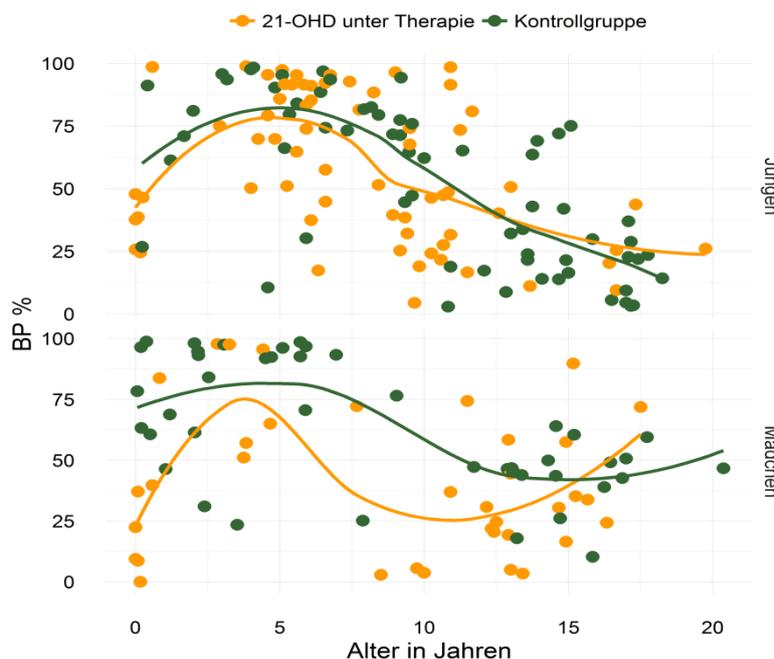


Abbildung 16: prozentualer Anteil klassischer und alternativer Weg an der DHT-Produktion

Prozentualer Anteil des alternativen Weges an der DHT-Produktion (y-Achse) nach dem Alter in Jahren (x-Achse) und getrennt nach Geschlecht der Kontroll- (grün) und der Patientenkohorte unter Therapie (gelb) dargestellt als Punktdiagramm. Der Mittelwert ist als Linie dargestellt. Die Abbildung des klassischen Weges (TP) verläuft antiparallel (hier nicht dargestellt).

Bei der prozentualen Darstellung fällt auf, dass sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Therapiepatientinnen und -patienten der prozentuale Anteil des BPs nach der Geburt bis zum circa fünften Lebensjahr ansteigt. Danach kommt es zum

Abfall des prozentualen BP-Anteils nach dieser Berechnung. Dabei ist die Abnahme des BPs in Prozent bei den männlichen Probanden ab dem circa fünften Lebensjahr über die Pubertät bis zur Volljährigkeit stabil, während der prozentuale BP-Anteil der weiblichen Probandinnen ab dem circa 15. Lebensjahr eher wieder einen Anstieg erfährt.

Der prozentuale TP-Anteil verhält sich nach der verwendeten Berechnungsformel genau spiegelverkehrt (nicht in der Abbildung dargestellt).

4. Diskussion

Durch die entwickelte Methode konnten zunächst die DHT- sowie die Androstandiol- und Androsteronkonzentrationen im Plasma der unterschiedlichen Kollektive gemessen und verglichen werden. Zusätzlich wurden die Korrelationen zwischen BP-Steroiden und klinischen Parametern beziehungsweise anderen Hormonen der Androgensynthese untersucht.

Die Stärken der vorliegenden Ausarbeitung liegen vor allem in der validen Untersuchung von Steroid- und Hormonkonzentrationsbestimmung mittels Tandem-Massenspektrometrie. Die Entwicklung der neuen Methode zur Messung der BP-Steroide mittels Massenspektrometrie fand in einem Labor statt, in dem das hochsensitive, anerkannte Verfahren zu den Routineanalyseverfahren gehört. Das Labor ist in Bezug auf die Massenspektrometrie akkreditiert und die Routinemethode zur Messung der klassischen Hormone publiziert (11, 36).

Aufgrund der Seltenheit der AGS-Erkrankung ist ein Nachteil dieser Arbeit die geringe Probenanzahl, vor allem in den einzelnen Altersgruppen. Durch die retrospektive Analyse besteht eine hohe Heterogenität der Kollektive, durch die eine hohe Varianz zu erwarten ist. Außerdem konnten einige Werte rückwirkend nicht ermittelt werden. Des Weiteren bleiben durch die retrospektive Betrachtung und die ambulante Behandlung der Patientinnen und Patienten die Langzeitverläufe und Therapieregime der Therapiepatientinnen und -patienten unsicher. Das Kontrollkollektiv besteht aus Proben mit nicht bestätigtem Verdacht auf Kleinwuchs, also laborchemisch gesunden Kindern, jedoch ist nicht bekannt, ob die Kinder über den Verdacht hinaus gesund waren. Im Folgenden werden die Ergebnisse, ihre Korrelationen und Signifikanzniveaus aus Kapitel drei näher diskutiert.

4.1 DHT

DHT ist das peripher wirksame Endprodukt der Androgensynthese. Auch beim alternativen Weg ist die Umwandlung von Androstandiol zu DHT der letzte Syntheseschritt. Findet eine Bildung der BP-Steroide zusätzlich zur testosteronvermittelten DHT-Synthese statt, müsste bei den AGS-Patientinnen und -Patienten auch vermehrt DHT gefunden werden.

Laut Kamrath et al. (30) könnte es bei 21-OHD-Patientinnen und -Patienten durch erhöhte DHT-Werte zu einer verstärkten Virilisierung bei erhöhter Androsteronausscheidung mit dem Urin kommen, obwohl die Zwischenprodukte des klassischen Weges (DHEA, Testosteron) völlig unauffällig sein können. Es wird ver-

mutet, dass ein Teil der Überproduktion der Androgene dem neuen Syntheseweg entstammt (30). Wie unter 3.1 beschrieben, wurden hier beim 21-OHD erstmals signifikant erhöhte DHT-Werte im Plasma im Vergleich zum Kontrollkollektiv festgestellt.

Die Mädchen mit 21-OHD zeigen zwar niedrigere DHT-Plasmakonzentrationen als die Jungen, jedoch sind die DHT-Konzentrationen dabei altersunabhängig im Vergleich zum weiblichen Kontrollkollektiv deutlich erhöht. Die DHT-Konzentration bleibt also trotz Therapie auf einem erhöhten Konzentrationsniveau und könnte zum Phänotyp der Erkrankung beitragen. Bei unauffälligen Hormonkonzentrationen des klassischen Weges könnte das überproduzierte DHT aus dem BP stammen. Die Therapie scheint für die Normalisierung der DHT-Plasmakonzentration nicht effizient genug.

Ebenso unterscheiden sich die DHT-Plasmakonzentrationen der männlichen präpubertären 21-OHD-Patienten signifikant von denen des Kontrollkollektives. Auch hier kann man eine erhöhte Produktion des DHTs über den BP trotz Therapie diskutieren. Mit Beginn der Pubertät, circa ab dem neunten Lebensjahr, gleichen sich die DHT-Plasmakonzentrationen an die des Kontrollkollektives an. Das heißt, dass die präpubertären Probanden trotz Therapie erhöhte DHT-Plasmakonzentrationen haben, die sich erst mit Beginn der Pubertät, also dem Beginn der gonadalen Hormonproduktion, an die Konzentrationen des Kontrollkollektives angleichen. Welche Rolle die Pubertät bei der „Normalisierung“ der DHT-Werte spielt, zum Beispiel ob der klassische Weg eine größere Rolle für die pubertäre Entwicklung spielt als der BP, und ob die einzelnen DHT-Werte nicht trotzdem individuell zu hoch sind, bleibt offen.

4.2 Backdoorpathway Steroide

Die Steroide des BPs sind im Serum beziehungsweise Plasma des Kontrollkollektives messbar. Der BP ist somit ein natürlich bestrittener Hormonweg des menschlichen Körpers, der für die Geschlechtsentwicklung wichtig sein kann (28). Auch bei den Neudiagnosen und therapierten 21-OHD-Patientinnen und -Patienten lassen sich die BP-Steroide messen.

Kamrath et al. wiesen schon erhöhte BP-Steroide beim 21-OHD im Urin nach (27). Eine zusätzliche DHT-Produktion beim 21-OHD über den BP, die zur verstärkten Virilisierung beiträgt, könnte also aus dem alternativen Pfad stammen.

4.2.1 Geschlechterunterschied

Vergleicht man die Jungen- mit der jeweiligen Mädchenkohorte, gibt es keine signifikanten Unterschiede für Androstandiol oder Androsteron, weder insgesamt noch in der Aufteilung in die einzelnen Alters- und Patientinnen- und Patientengruppen.

Trotz unterschiedlicher Expressionsmuster der Gene HSD3B2, SRD5A1/2, AKR1C2/4, CYP17A1 und 17 β HSD3 im Ovar und den Testes (32) finden sich zwischen Mädchen und Jungen weder im Kontroll- noch im Patientinnen- und Patientenkollektiv signifikante Unterschiede.

4.2.2 Vergleich der Kontrollkohorte mit der 21-OHD-Kohorte

Erkennbar ist, dass für Androstandiol im männlichen 21-OHD-Kollektiv unter Therapie altersunabhängig höhere Plasmakonzentrationen vorkommen als im Kontrollkollektiv, was einerseits darauf hinweisen kann, dass der BP bei 21-OHD-Patienten vermehrt bestritten und auch durch die Therapie nicht vollständig ausgeglichen wird. Auf der anderen Seite beschreiben Penning et al. (29), dass die Umwandlung von Androstandiol zu DHT in beide Richtungen funktioniert, d.h. dass Androstandiol zu DHT, aber auch DHT zu Androstandiol umgewandelt werden kann. Das spricht dafür, dass Androstandiol nicht nur als Vorstufe des DHTs, sondern auch als Speicherform bei erhöhten DHT-Werten fungieren kann (29). Erhöhte Androstandiolkonzentrationen könnten dabei also nicht nur einen stärker beschrittenen BP anzeigen, sondern könnten auch auf eine erhöhte Speicherung des beim 21-OHD erhöhten DHTs hinweisen. Dies würde auch erklären, warum zwar die Androstandiol-, aber nicht die Androsteronplasmakonzentration signifikant von denen des Kontrollkollektivs abweicht.

Bei den Mädchen besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Androstandiolplasmakonzentrationen der Kontroll- und Patientinnengruppe. Da in dieser Studie bei den Mädchen mit 21-OHD dennoch erhöhte DHT-Plasmakonzentrationen gemessen werden konnten, spräche dies eher für eine hauptsächliche Produktion aus dem klassischen Weg. Eine weitere Erklärung kann das geringere Expressionsniveau der BP-Enzyme im Ovar als in den Testes sein (32).

Mit dem Alter verändert sich die Konzentration der Geschlechtshormone, zum Beispiel steigt die Testosteronkonzentration vor allem bei Jungen mit Beginn der Pubertät an. Auch die Androstandiolkonzentration der Kontrollgruppe verändert sich altersabhängig und steigt zwischen dem nullten und fünften Lebensjahr sowohl bei

den Mädchen aber vor allem bei den Jungen an, um danach auf einem stabilen Niveau zu verbleiben beziehungsweise leicht abzufallen. Dies kann darauf hinweisen, dass der BP als physiologischer Hormonweg eher in der postnatalen, präpubertären Phase Bedeutung hat und mit Einsetzen der Pubertät durch den klassischen Weg abgelöst wird. Auch eine pränatale Anstoßung des Weges ist denkbar (28). Welche Rolle der BP in der weiteren physiologischen pubertären Entwicklung spielt, lässt sich anhand dieser Daten nicht sagen. Eine Korrelation zwischen Androstandiol und dem Alter besteht weder im Kontroll- noch im Patientinnen- und Patientenkollektiv.

Die 21-OHD-Patientinnen und -Patienten zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe bereits in den ersten Lebensstagen höhere Plasmakonzentrationen für Androstandiol und befinden sich stetig auf einem höheren Niveau.

Die Androsteronplasmakonzentration zeigt bei beiden Geschlechtern keine signifikante Erhöhung bei den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Bei der Aufschlüsselung des Therapie- und Kontrollkollektives nach dem Alter undulieren die Werte der Mädchen ungefähr um den gleichen niedrigen Mittelwert und bleiben altersunabhängig auf einem Konzentrationsniveau. Bei den männlichen Kontrollproben verbleibt die Androsteronkonzentration zunächst bis zum circa zehnten Lebensjahr auf einem niedrigen Niveau. Mit Beginn der Pubertät kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Androsteronwerte. Es besteht also ein Trend, dass die Androsteronkonzentration mit steigendem Alter vor allem mit der Pubertät eher zunimmt, es lässt sich allerdings keine starke Korrelation mit dem Alter feststellen.

Der fehlende Unterschied bezüglich des Androsterons zwischen dem Kontroll- und Therapiekollektiv lässt eine nicht lineare Umwandlung von Androsteron zu Androstandiol vermuten. Auch eine Biosynthese durch andere Hormonwege, zum Beispiel durch Androstendion, ist denkbar (26). Durch die therapiebedingte Senkung der Hormone des klassischen Weges, vor allem 17-OHP, scheint so eine größere Annäherung der Androsteronkonzentration an das Kontrollkollektiv möglich zu sein.

4.2.3 Vergleich von Neudiagnosen und Kontrollpatientinnen und -patienten beziehungsweise 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie

Bei Androsteron unterscheiden sich die Patientinnen und Patienten mit Neudiagnosen signifikant von den Therapiepatientinnen und -patienten und von den Kontrollen. Hierbei fallen die im Vergleich zu den Kontrollen und Therapiepatientinnen und -

patienten extrem höheren Werte der Patientinnen und Patienten mit Neudiagnose eines 21-OHD auf.

Kamrath et al. (30) konnten in ihrer Arbeit 2012 herausfinden, dass Patientinnen und Patienten mit 21-OHD deutlich mehr Androsteron mit dem Urin ausscheiden. Nach Meinung dieser Autoren kann Androsteron zwar auch aus DHEA, Androstendion und Testosteron synthetisiert werden, jedoch nicht in der vorliegenden Menge (30). Die zusätzliche Produktion von Androsteron aus dem BP kann die extrem erhöhten Werte unserer Patientinnen und Patienten mit Neudiagnosen erklären. Auch eine größere pränatale Rolle des Androsterons, die früh postnatal an Bedeutung verliert, ist möglich, jedoch durch die vorliegenden Daten nicht zu attestieren.

Die Plasmakonzentrationen der Therapiepatientinnen und -patienten ähneln wieder denen des Kontrollkollektives, was darauf schließen lässt, dass die Androsteronplasmakonzentration der Patientinnen und Patienten unter Therapie im Vergleich mit Patientinnen und Patienten mit neudiagnostiziertem 21-OHD durch die Therapie stark supprimiert wird; stärker als der Einfluss der Therapie auf Androstandiol.

Bei den Patientinnen und Patienten mit Neudiagnose eines 21-OHD konnten zwar höhere Androstandiolplasmakonzentrationen als bei den Kontrollen gemessen werden, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Darüber hinaus fallen bei den Neudiagnosen im Vergleich zu den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie niedrigere Plasmakonzentrationen für Androstandiol auf. Eine erhöhte Androstandiolplasmakonzentration scheint also nicht sicher funktionell mit dem 21-OHD zu korrelieren oder der BP scheint noch insuffizient zu sein. Die Umwandlung von extrem erhöhtem Androsteron zu Androstandiol findet dabei nicht linear statt.

4.2.4 Vergleich von gut und laborchemisch ungenügend eingestellten 21-OHD-Patientinnen und -Patienten

Der Vergleich der Therapiepatientinnen und -patienten (P) und der von uns definierten laborchemisch schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten (seP) verdeutlicht, dass vor allem die Quantifizierung von Androstandiol eine mögliche Ergänzung zur Einschätzung des Therapieansprechens liefert, denn es zeigt sich, dass bei den schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten signifikant höhere Androstandiolplasmakonzentrationen vorkommen als bei den übrigen Therapiepatientinnen und -patienten.

Der Abfall der Androstadiolplasmakonzentration mit dem Alter ist bei den schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten nicht so wie beim Kontrollkollektiv zu beobachten.

Die mangelnde Suppression von Androstadiol durch die Therapie kann dabei bedeuten, dass die Therapiemaßnahmen auf der einen Seite nicht suffizient genug sind oder auf der anderen Seite die Medikamente nicht ordnungsgemäß eingenommen wurden.

Androsteron dagegen zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen seP und P. Wie bereits unter 4.2.3 beschrieben, fallen die Androsteronplasmakonzentrationen durch die Therapie der Patientinnen und Patienten mit Neudiagnose im Vergleich zu Therapiepatientinnen und -patienten stark ab. Dies kann auch die Hypothese von Kamrath et al. unterstützen, dass Androsteron nicht nur aus dem BP entsteht (30).

Bei der Therapieführung des 21-OHD orientiert man sich derzeit an jährlichen Röntgenkontrollen der linken Hand sowie der Bestimmung der Androstendion- und Testosteronwerte aus dem Blut. Die Messung der BP-Steroide könnte einen Beitrag zur Einschätzung der Therapieeinstellung unabhängig von den Röntgenbildern liefern, auch wenn für die Frage, ob die BP-Steroide als Verlaufsparemeter der Therapiegüte ausreichen, prospektive Studien durchgeführt werden müssten.

4.2.5 Urin

Kamrath et al. (2012) haben die BP-Steroide im Urin eines 21-OHD-Kollektives gemessen und bei den AGS-Patientinnen und -Patienten erhöhte Konzentrationen im Urin nachgewiesen (30). Auch bei den hier verwendeten Urinproben sind die beiden BP-Steroide mit der entwickelten Methode detektierbar. Beim Vergleich der Urin- mit den jeweiligen Blutproben zum gleichen Therapiezeitpunkt lassen sich allerdings keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den Werten der Blutprobe und der dazugehörigen Urinprobe feststellen. Mögliche Ursachen für den mangelnden Zusammenhang können eine höhere Empfindlichkeit der BP-Steroidkonzentrationen im Urin oder der Einfluss von mehr Störfaktoren sein. Auffällig ist dabei auch, dass die Androsteronwerte höher als die Androstadiolwerte im Urin der Patientinnen und Patienten und demnach genau gegenteilig zu den Blutwerten sind.

Der Vergleich zwischen dem Kontrollkollektiv und den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten konnte nicht durchgeführt werden, da retrospektiv keine Urinproben zum Blutabnahmezeitpunkt der Kontrollpatientinnen und -patienten vorlagen.

4.3 Korrelation zwischen BP und klinischen Daten

Die Untersuchung der BP-Steroide und der klinischen Daten erfolgte, um mögliche Zusammenhänge des BP und den Phänotypen im Kontroll- und Therapiekollektiv nachzuweisen.

Neben dem Alter, der Wachstums- und BMI-Perzentile, dem Knochenalter und der Genetik ist auch eine Korrelation der BP-Steroide mit den Prader- oder Tanner-Stadien denkbar. Aufgrund der retrospektiven Aktenlage auch in Bezug auf die Kontrollpatientinnen und -patienten waren nicht genug Prader- beziehungsweise Tanner-Stadien ermittelbar.

4.3.1 Wachstumsgeschwindigkeit

Eine gute Therapieeinstellung sollte eine altersentsprechende Entwicklung ermöglichen. Durch die hohe Androgenkonzentration wachsen die AGS-Patientinnen und -Patienten zu früh und zu schnell, sodass ihr Knochenalter zum biologischen Alter akzeleriert. Die linke Hand der AGS-Patientinnen und -Patienten der Kinder- und Jugendmedizin I am UKSH Campus Kiel wird aus diesem Grund zur Überprüfung der Abweichung einmal im Jahr geröntgt. Jedoch ließen sich retrospektiv die gewünschten Knochenalter nur in einigen wenigen Fällen ermitteln. Zudem ist es für die Analyse problematisch, dass für eine Patientin beziehungsweise einen Patienten in einem Jahr zwar mehrere Messungen von Blutproben zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten, jedoch nur ein Knochenalter pro Jahr existieren. Die Frage, welcher Hormonwert mit dem Knochenalter der Patientin beziehungsweise des Patienten in Zusammenhang gebracht werden soll, scheint demzufolge berechtigt. Des Weiteren weichen die gefundenen Knochenalter bis auf eine Ausnahme maximal sechs Monate vom tatsächlichen Alter ab, was in der Regel auf eine gute Therapieeinstellung hinweist, zumal die Interpretation des Alters anhand der Röntgenbilder auch vom Untersucher abhängig ist.

Aus diesem Grund wurde nicht das Knochenalter, sondern die Perzentile der Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Prozent der Patientinnen und Patienten unter Therapie mit Androstandiol und Androsteron korreliert. Bei den Neudiagnosen fehlen aussagekräftige Informationen zum Körpergewicht, beziehungsweise ist ein Wachstumswert aufgrund des Alters kleiner als vier Wochen nicht möglich, sodass diese nicht mit in die Untersuchung eingebunden werden konnten.

Die Werte für die Perzentile der Wachstumsgeschwindigkeit (cm/Jahr) in Prozent der Patientinnen und Patienten unter Therapie lagen zu den jeweiligen Analyse-

zeitpunkten der Blutproben vor. Geschlechts- und kollektivunabhängig ließen sich zwar keine starken Korrelationen für beide Steroide zeigen, jedoch besteht für Androstadiol ein positiver Trend. Das heißt, dass die Wachstumsgeschwindigkeitsperzentilen der Patientinnen und Patienten umso höher sind, je höher die Androstadiolwerte sind. Pettersson et al. berichten, dass Androstadiol ein Agonist am Östradiol β -Rezeptor ist und eine Rolle im Wachstumsprozess spielen kann (42). Die erhöhten Androstadiolwerte des männlichen Patientenkollektivs könnten also zum Wachstum beitragen. Dies passt auch zu den unter 4.2.4 nochmals erhöhten Androstadiolkonzentrationen der schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten, bei denen, neben stark erhöhten Androstendion und 17 OHP-Werten, auch ein verfrühtes, beschleunigtes Wachstum erwartet wird. Beim Kontrollkollektiv waren zwar die BMI-Werte bekannt, jedoch besteht die Kontrollgruppe durch die retrograde Analyse aus einem Kollektiv nicht bestätigter Kleinwuchspatientinnen und -patienten und ist somit für ihre Altersgruppe eher zu klein, sodass der Parameter Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile im Kontrollkollektiv nicht valide erscheint und somit kein guter Vergleich mit dem Kontrollkollektiv durchgeführt wurde.

4.3.2 BMI

Auch das Fettgewebe produziert eine Vielzahl an Hormonen im menschlichen Körper. Reinehr et al. (43) zeigten bei übergewichtigen präpubertären Kindern signifikant höhere Androgene (DHEAS, Androstendion und Testosteron) als bei normalgewichtigen Kontrollen. Zudem kam es nach Gewichtsverlust der Patientinnen und Patienten auch zur signifikanten Normalisierung von Androstendion und Testosteron im Vergleich zu den weiterhin übergewichtigen Patientinnen und Patienten (43). Deswegen muss ausgeschlossen werden, ob die BP-Steroide vor allem bei 21-OHD-Patientinnen und -Patienten mit hohem BMI vorkommen, also ob das Fettgewebe eine maßgebliche Beteiligung an der Produktion der BP-Steroide zeigt. Zur Analyse, ob die gemessenen BP-Steroidkonzentrationen mit dem Körpergewicht der Patientinnen und Patienten korrelieren, wurde die Perzentile des BMI gewählt. Es wurden die Perzentilen des BMI herangezogen und nicht der reine BMI, um den Einfluss des Alters auszuschließen. Bei erhöhtem BMI der Patientinnen und Patienten unter Therapie muss ebenfalls über eine eventuelle Überdosierung des Hydrocortisons diskutiert werden. Da bei den Messdaten keine starken Korrelationen der BMI-Perzentilenwerte existieren, ist eine überwiegende Produktion der BP-Steroide aus dem Fettgewebe somit unwahrscheinlich.

4.3.3 CYP21A2-Genotyp

Trotz der niedrigen Anzahl an Patientinnen und Patienten zeigen sich höhere BP-Steroide bei einer geringeren Restaktivität der 21-Hydroxylase beziehungsweise einer schwerwiegenderen Mutation. Dieser Trend ist bei Androsteron am deutlichsten. Je weniger 17OH-Progesteron zu 11-Deoxycortisol und 21-Desoxycortisol zu Cortisol durch die 21-Hydroxylase konvertiert wird, desto mehr wird der BP bestritten, was die Hypothese unterstützt, dass der BP bei 21-OHD biochemisch aktiv ist.

4.4 Korrelation zwischen Steroiden beziehungsweise Hormonen

Beim 21-OHD sind unter anderem erhöhte Konzentrationen für 17-OHP, Androstendion, Testosteron und 21-Desoxycortisol typisch. Soll also ein Großteil des sich anstauenden 17-OHP in den klassischen Weg mit erhöhten Androstendion- beziehungsweise Testosteronkonzentrationen geleitet werden, dürften nur geringe BP-Steroide vorkommen. Geht man davon aus, dass 17-OHP ein besseres Substrat für die 5 α -Reduktase (34) ist und dass die Virilisierung der Patienten trotz niedrigem Testosteron damit durch den BP stattfinden kann, sollten hohe Konzentrationen für Androstandiol und Androsteron bei niedrigem Androstendion beziehungsweise Testosteron zu finden sein. Es könnten allerdings sowohl erhöhte klassische Hormone als auch erhöhte alternative Steroide vorkommen, da 17-OHP parallel in beide Synthesewege umgewandelt wird.

4.4.1 Androstandiol

Sowohl beim Kontrollkollektiv als auch bei den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten unter Therapie sind keine Korrelationen zwischen Androstandiol und den Hormonen 17-OHP, Androstendion, Testosteron, DHT und 21-Desoxycortisol nachweisbar. Androstandiol war bei ansteigenden Konzentrationen von 17-OHP, Androstendion, Testosteron, DHT oder 21-Desoxycortisol nicht erhöht.

Eine fehlende Korrelation im Kontrollkollektiv kann regelhaft sein. Die Rolle des BPs in der menschlichen Entwicklung ist nach wie vor ungeklärt und kann auch nur eine unterstützende sein.

Das 21-OHD-Kollektiv steht unter Therapie. Das heißt, dass die Patientinnen und Patienten Hydrocortison und je nach Ausprägung auch Fludrocortison einnehmen, was Einfluss auf die Hormonkonzentration von 17-OHP, Androstendion, Testosteron und DHT nimmt und somit ein fehlender Zusammenhang zwischen Androstandiol und den Δ 5-Steroiden erklärt werden kann. Hierbei scheint der Einfluss der

Therapieeinstellung auf Androstandiol niedrig zu sein, da die Konzentrationen trotz Therapie altersunabhängig erhöht bleiben. Eine Produktion entsteht also unabhängig von der Therapie.

Zusätzlich könnten ortsabhängig Konzentrationsunterschiede für Androstandiol gelten, die einen Einfluss auf die Konzentration abhängig vom Blutabnahmeort haben, also in der Nähe der Geschlechtsorgane, dem Hauptzielort des DHT (zum Beispiel der Leiste) höher sein könnten als in der Armbeuge, dem typischen Blutabnahmeort.

Ebenfalls sollte über einen möglichen zirkadianen Rhythmus für Androstandiol wie in der Arbeit von Faiman et al. diskutiert werden (44). Dabei erreichen die Werte für FSH, Testosteron und Cortisol am Morgen ihr Maximum und fallen über den Tag ab. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Blutentnahmen nicht immer morgens oder zur gleichen Zeit erfolgten, sodass ein Einfluss unterschiedlicher Entnahmezeiten auf Wertschwankungen bleibt. Ein möglicher Bias ist auch, ob die BP-

Steroide einem Tagesrhythmus unterliegen und dementsprechend mit tageszeitpunktabhängigen Hormonkonzentrationen aus dem klassischen Weg verglichen werden können.

4.4.2 Androsteron

Androsteron korreliert bei den Jungen beider Kollektive mittelstark bis stark mit den Hormonen 17-OHP, Androstendion, Testosteron und DHT, was bedeutet, dass die Androsteronkonzentration bei steigenden $\Delta 5$ -Steroiden ebenfalls ansteigt.

Auf der einen Seite unterscheiden sich die Androsteronwerte nicht signifikant zwischen den Kontrollen und den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten. Da sich allerdings bei den Neudiagnosen stark erhöhte Werte nachweisen lassen, lässt sich daraus schließen, dass die Therapie einen größeren Einfluss auf die Androsteron- als auf die Androstandiolwerte hat und sich Kontrollen und 21-OHD-Patientinnen und -Patienten in ihren Korrelationen deswegen mehr ähneln können.

Auf der anderen Seite erklärt sich eine Korrelation zwischen Androsteron und Androstendion daraus, dass Androsteron aus dem ebenfalls erhöhten Androstendion entstehen kann (26).

Dagegen korreliert Androsteron bei den weiblichen Kontrollen nicht mit den $\Delta 5$ -Steroiden, jedoch bei den weiblichen 21-OHD-Patientinnen mit Testosteron und Androstendion, was die Entstehung aus Androstendion einerseits unterstreicht, aber

andererseits auch auf eine andere Rolle des BPs im weiblichen Organismus hinweist.

4.4.3 17-OHP

17-OHP akkumuliert beim Krankheitsbild des 21-OHD, da es durch den Defekt der 21-Hydroxylase nicht in 11-Desoxycortisol umgewandelt wird. Das angehäuften 17-OHP wird deswegen unter anderem über die Umwandlung zu Testosteron oder 21-Desoxycortisol abgebaut. Da 17-OHP ein gutes Substrat für die 5 α -Reduktase (34) ist, besteht ebenfalls ein erhöhter Reaktionsdruck in den alternativen Pfad. Daraus lässt sich postulieren, dass bei erhöhten 17-OHP-Werten auch gestiegene BP-Steroide vorkommen müssten.

Bei den männlichen Probanden des Kontroll- und Therapiekollektives korreliert 17-OHP stark mit den Hormonen des klassischen Pfades und mittelstark mit Androsteron, jedoch nicht mit Androstadiol. Das heißt, dass bei erhöhten 17-OHP-Werten beide Wege zum Abbau der Akkumulation bestritten werden können.

Bei den weiblichen Kontrollprobandinnen korreliert 17-OHP ebenfalls mit den klassischen Hormonen, was beim weiblichen 21-OHD-Kollektiv nicht mehr nachweisbar ist und zeigt, dass hier eine andere Gewichtung der Pfade stattfindet.

Die Korrelation von 17-OHP zu 21-Desoxycortisol im 21-OHD-Kollektiv spiegelt die labordiagnostische Komponente wider, indem 17-OHP zwar zu 21-Desoxycortisol, aber nicht weiter zu Cortisol umgewandelt werden kann. Je niedriger also die Restaktivität und je mehr 17-OHP vorhanden ist, desto weniger Cortisol und desto mehr 21-Desoxycortisol müssen nachzuweisen sein.

4.4.4 Testosteron/Androstendion

Sowohl für die Mädchen als auch für die Jungen beider Kollektive ist für Androstadiol kein Zusammenhang mit Testosteron oder Androstendion ersichtlich, was zunächst darauf hinweist, dass keine Verbindung der beiden Hormonwege besteht.

Für das männliche Kontrollkollektiv und beide Geschlechter der 21-OHD-Patientinnen und -Patienten gilt jedoch, dass umso mehr Androsteron detektierbar ist, je mehr Androstendion beziehungsweise Testosteron gemessen wird. Da Androsteron auch aus Androstendion entstehen kann (26), kann der vermeintliche Zusammenhang zwischen klassischem Weg und BP erklärt werden.

4.4.5 DHT

Da keine Korrelation zwischen den BP-Steroiden und DHT bei den Kontrollen existiert, ist es möglich, dass nicht alle Steroide des BPs direkt in DHT umgewandelt werden, es also keinen proportionalen beziehungsweise linearen Zusammenhang gibt. Penning et al. beschreiben, dass die Umwandlung von Androstandiol zu DHT in beide Richtungen funktioniert, was den mangelnden Zusammenhang erklären kann und dafür spricht, dass Androstandiol nicht nur als Vorstufe des DHTs, sondern auch als Speicherform fungieren kann (29).

Dazu kommt, dass die Umwandlung der DHT-Vorläufer in der Peripherie stattfindet, sodass sich auch hier die Frage stellt, ob der Abnahmeort oder die Abnahmezeit der Blutprobe eine Rolle spielen.

Bei den männlichen 21-OHD-Patienten korreliert Androsteron mit DHT signifikant, bei den Mädchen dagegen nicht. Androsteron kommt dabei nicht nur im BP vor, sondern kann unter anderem auch durch die Umwandlung aus Androstendion entstehen (26). Da bei den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten signifikant höhere Androstendionwerte als bei den Kontrollen gemessen wurden, kann ein Zusammenhang im Unterschied zum Kontrollkollektiv durch erhöhte Androsteronproduktion aus Androstendion entstehen. Dabei haben die weiblichen Patientinnen nochmals signifikant höhere Androstendionwerte als die männlichen Patienten, wodurch die Korrelation zwischen Androsteron und DHT wieder an Signifikanz verliert.

Es lässt sich eine starke Korrelation zwischen Testosteron und DHT bei den männlichen Patienten nachweisen, also vom direkten DHT-Vorläufer des klassischen Syntheseweges. Diese Umwandlung funktioniert nur von Testosteron zu DHT und lässt auf einen linearen Zusammenhang schließen, obwohl auch erhöhte BP-Steroide nachzuweisen sind, die zu erhöhten DHT-Werten führen können. Dieser Zusammenhang besteht bei den weiblichen Patientinnen dagegen nicht. Im Gegensatz zu den Jungen haben sie zwar erhöhte DHT- und auch Testosteronwerte, jedoch keine erhöhten BP-Steroide im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Das weist darauf hin, dass die DHT Überproduktion bei den 21-OHD-Jungen sowohl aus dem klassischen wie auch aus dem alternativen Pfad stammen kann. Bei den Mädchen gibt es dagegen Hinweise, dass die erhöhten DHT Werte beim 21-OHD vor allem über den klassischen Weg über Testosteron produziert werden und der BP eine geringere Rolle spielt.

4.5 Quotient Backdoorpathway zu klassischem Pathway

Durch die Ratio am Beispiel von Kamrath (30) soll der Anteil des BPs am Kontrollkollektiv und am Krankheitsbild des 21-OHD besser eingeordnet werden.

Kontroll- und Therapiepatientinnen und -patienten zeigen eine Durchmischung der prozentual errechneten Synthesewege. Bei allen betrachteten Gruppen existieren Patientinnen und Patienten, bei denen die Hormonproduktion prozentual errechnet hauptsächlich nur aus einem Weg stammt. Eine fast vollständige Beteiligung des BPs nach dieser Berechnung ist also auch im Kontrollkollektiv modellbedingt. Die hier gewonnenen Erkenntnisse decken sich auch mit der Aussage von Kamrath et al., dass eine Bestreitung des BPs von der Expression beziehungsweise von der Aktivität der BP-Enzyme abhängt (27).

Der Unterschied zwischen den Kontroll- und den Therapiepatientinnen und -patienten spiegelt wider, dass zumindest die männlichen Probanden sich noch signifikant in ihren Androstandiolwerten unterscheiden. Die Therapie scheint also noch keinen Angleich der Anteile an die der Kontrollpatientinnen und -patienten zu schaffen. Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass die Entwicklung der BP- und TP-Anteile bei den männlichen Probanden beider Gruppen sehr ähnlich verläuft. Bei der Beobachtung der beiden Kollektive und deren unterschiedlichen prozentualen Synthesepfade im Verhältnis zum tatsächlichen Alter fällt auf, dass die Bedeutung des BPs zunächst hoch ist und mit den Jahren abnimmt. Der prozentuale Anteil des TPs dagegen ist erst sehr gering und nimmt mit dem Alter stark zu. Dies ist auch vereinbar mit der These von Flück et al. (28), dass die BP-Steroide vor allem auch eine Rolle in der prä- und postnatalen Geschlechtsentwicklung spielen.

Der entscheidende Wendepunkt scheint um das circa achte Lebensjahr zu liegen. Hier kommt es zur starken Verschiebung der Verhältnisse, bis zwischen dem fünfzehnten und achtzehnten Lebensjahr die Maximalwerte für TP und die Minimalwerte für BP erreicht werden. Der prozentuale Anteil des BPs der 21-OHD-Patientinnen und -patienten unter Therapie ist bei ähnlichem Verlauf niedriger als beim Kontrollkollektiv. Dies ist rechnungsbedingt und vor allem auf die durch die Therapie stark gesenkten Androsteronkonzentrationen zurückzuführen.

Bei den weiblichen Kollektiven differiert die Entwicklung der prozentualen TP- und BP-Anteile stärker als bei den Jungen. Es kommt zwar auch zu einer prozentualen Abnahme der BP-Steroide und zu einer prozentualen Zunahme der TP-Hormone mit dem Alter, jedoch haben die Kontrollen höhere BP-Anteile als die 21-OHD-Mädchen.

Es lässt sich also postulieren, dass der BP eine physiologische Bedeutung vor allem in der präpubertären Lebensphase hat, die während der Pubertät stetig abnimmt und bei den Mädchen ausgeprägter zu sein scheint als bei den Jungen. Ob der BP-Anteil auch postnatal hoch ist, lässt sich aufgrund der in diesem Alter fehlenden Kontrollen nicht ablesen. Auch der Beitrag des BPs zur Pubertät bleibt offen.

4.6 Fazit

Bei den 21-OHD-Patientinnen und -Patienten kommen höhere DHT-Werte als im Kontrollkollektiv vor. Die Steroide des BPs lassen sich mit der Massenspektrometrie im Serum/Plasma nachweisen. Sie finden sich sowohl in Messungen des Kontrollkollektivs als auch bei AGS-Patientinnen und -Patienten aufgrund eines 21-OHDs. Die erhöhten DHT-Konzentrationen des 21-OHD-Patientinnen- und -Patientenkollektivs können durch die BP-Steroide entstehen.

Dabei sind beim Kollektiv der Neudiagnosen die Androsteronwerte und beim Therapiekollektiv die Androstandiolwerte signifikant höher im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Anhand einer prozentualen Betrachtung nimmt die Bedeutung des BPs mit steigendem Alter ab. Welchen Beitrag dieser jedoch zur Geschlechtsentwicklung bei den Kontrollen beiträgt, bleibt offen. Es ist sowohl möglich, dass Androsteron und Androstandiol hauptsächlich aus dem BP entstehen, aber auch, dass Androstandiol als Speicherform des DHTs fungiert und Androsteron vorrangig aus dem überproduzierten Androstendion produziert wird. Die BP-Steroide sind sowohl alters- als auch geschlechtsunabhängig. Es kommen bei laborchemisch schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten nochmals deutlich höhere Androstandiolwerte vor, sodass Androstandiol neben 17-OHP, Androstendion und Testosteron ein Monitoring des Therapieansprechens darstellen könnte.

Korrelationen zwischen Androsteron und Androstendion, Testosteron beziehungsweise 17-OHP zeigen, dass 17-OHP sowohl über den TP als auch den BP verstoffwechselt wird. Diese Korrelationen für Androsteron finden sich auch beim Kollektiv unter Therapie wieder, was zeigt, dass die Therapie im Vergleich zu den Neudiagnosen eine Annäherung an das Kontrollkollektiv schafft.

Die Höhe der BP-Steroide hängt dabei mit dem Schweregrad der Mutation zusammen. Explizit erhöhte Androstandiolwerte weisen dabei einen Trend mit der Wachstumsratenperzentile auf, was auf eine Beteiligung an verfrühtem und beschleunigtem Wachstum hindeuten kann.

5. Zusammenfassung

Der Backdoorpathway ist ein alternativer Syntheseweg zum Dihydrotestosteron unter Umgehung der klassischen Hormone Androstendion und Testosteron im Tammar Wallaby. Dieser alternative Weg führt von 17-Hydroxy-Pregnenolon über die Zwischenschritte 17α -Hydroxyprogesteron, 17α -Hydroxyallopregnanolon, Androsteron und Androstandiol zum im peripheren Zielgewebe gebildeten Dihydrotestosteron. Dabei kann Dihydrotestosteron aber auch zurück zu Androstandiol umgewandelt werden. Dieser Syntheseweg stellt somit die aktive Form des männlichen Geschlechtshormons unter Umgehung von Testosteron her. Beim 21-Hydroxylase-Mangel liegen erhöhte 17α -Hydroxyprogesteronkonzentrationen vor und es gibt Literaturhinweise zu einem aktiven Backdoorpathway.

Diese Arbeit untersuchte zunächst die Hypothese, dass Patientinnen und Patienten mit 21-Hydroxylase-Mangel erhöhte Dihydrotestosteron-Konzentrationen aufweisen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die Backdoorpathway Steroide auch im Serum/Plasma des Menschen nachweisen lassen und ob diese beim 21-Hydroxylase-Mangel erhöht sind. Dazu wurde im Rahmen der Doktorarbeit eigenständig eine Analysemethode entwickelt, um die Steroide Androstandiol und Androsteron mit Hilfe der Festphasenextraktion und der Tandem Massenspektrometrie im Serum/Plasma zu messen.

Es wurden 105 Proben (männlich: N= 62, weiblich: N= 43) der Kinderklinik des UKSH Kiels mit nicht bestätigtem Verdacht auf Kleinwuchs als Kontrollen festgelegt und retrospektiv gemessen. Die Patientinnen und Patienten des Kontrollkollektivs mussten IGF1-Werte über der 25. Perzentile und einen Testosteronwert im Referenzbereich haben. Das 21-Hydroxylase-Mangel-Kollektiv umfasste 17 Serum-/Plasmaproben von Neudiagnosen (männlich: N= 7, weiblich: N= 10) jünger als vier Wochen und 101 Serum-/Plasmaproben von Patientinnen und -Patienten (männlich: N= 65; weiblich: N= 36) mit Adrenogenitalem Syndrom infolge einer 21-Hydroxylase-Mangels unter Therapie zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten inklusive 34 laborchemisch schlecht eingestellten Patientinnen und Patienten mit Hyperandrogenämie.

Zunächst wurde festgestellt, dass 21-Hydroxylase-Mangel-Patientinnen und -Patienten im Serum/Plasma trotz Therapie signifikant höhere Dihydrotestosteron-Werte aufwiesen.

Die Steroide des Backdoorpathways ließen sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei den Neudiagnosen und Therapiepatientinnen und -patienten im Se-

rum/Plasma nachweisen. Dabei bestand keine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit. Die männlichen Patienten unter Therapie wiesen sowohl präpubertär als auch pubertär signifikant höhere Konzentrationen für Androstandiol trotz Therapie im Vergleich zu den männlichen Kontrollen auf. Auffällig war ebenfalls, dass bei laborchemisch schlecht eingestellten Patienten nochmals signifikant höhere Androstandiolwerte im Vergleich zum Therapiekollektiv vorkamen. Die Daten sprechen dafür, dass Androstandiol sowohl über 17α -Hydroxyprogesteron im Backdoorpathway als auch aus Dihydrotestosteron selber entsteht. Bei den Mädchen war der Unterschied nicht signifikant nachweisbar. Für Androsteron fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patientinnen und Patienten unter Therapie und den Kontrollen. Allerdings fielen extrem hohe Werte bei den Neudiagnosen im Vergleich zu den Kontrollen und den Therapiepatientinnen und -patienten auf. Die erhöhten Konzentrationen von Backdoorpathway Steroiden weisen daraufhin, dass die erhöhten Dihydrotestosteronkonzentrationen bei 21-Hydroxylase-Mangel mit einem aktiveren Backdoorpathway zu erklären sein könnten.

Es ließ sich keine Korrelation zwischen den Backdoorpathway Steroiden der Kontrollen, der Neudiagnosen und der Therapiepatientinnen und -patienten sowie deren jeweiligen BMI, deren Wachstumsgeschwindigkeitsperzentie oder Knochenalter feststellen. Erhöhte Androstandiolwerte standen beim 21-Hydroxylase-Mangel-Kollektiv allerdings in einem schwachen Zusammenhang mit einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeitsperzentile, was zu einem verfrühten und beschleunigten Wachstum beitragen könnte. Nach der Einteilung der 21-Hydroxylase-Mangel-Patientinnen und -Patienten in Schweregrade anhand der prädiktiven Restaktivität aufgrund des CYP21A2-Mutationsstatus zeigten sich bei geringerer Restaktivität höhere Androsteronwerte.

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit, dass beim Adrenogenitalen Syndrom durch 21-Hydroxylase-Mangel erhöhte Dihydrotestosteronkonzentrationen vorliegen, und sie sprechen dafür, dass diese aus einem verstärkt aktiveren Backdoorpathway stammen könnten. Über diesen Weg könnte der Backdoorpathway sowohl den klinischen Phänotyp als auch die individuelle Stoffwechselsituation beeinflussen. Die Relevanz der Backdoorpathway Steroide für das klinische Management des 21-Hydroxylase-Mangels sollte daher in prospektiven klinischen Studien untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. TURCU, A.F., AUCHUS, R.J. (2017). Clinical significance of 11-oxygenated androgens. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, **24**(3), 252-259.
2. SPEISER, P.W., AZZIZ, R., BASKIN, L.S., GHIZZONI, L., HENSLE, T.W., MERKE, D.P., MEYER-BAHLBURG, H.F.L., MILLER, W.L., MONTORI, V.M., OBERFIELD, S.E., RITZEN, M., WHITE, P.C. (2010). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **95**(9), 4133-4160. ISSN 0021-972X.
3. KRONE, N., ARLT, W. (2009). Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, **23**(2), 181-192.
4. SPEISER, P.W., WHITE, P.C. (1998). Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clinical endocrinology*, **49**(4), 411-417.
5. RIEPE, F.G., KRONE, N., VIEMANN, M., PARTSCH, C.-J., SIPPELL, W.G. (2002). Management of congenital adrenal hyperplasia: results of the ESPE questionnaire. *Hormone research*, **58**(4), 196-205. ISSN 0301-0163.
6. RIEPE, F.G., SIPPELL, W.G. (2007). Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, **8**(4), 349-363. ISSN 1389-9155.
7. CHRISTAKOUDI, S., COWAN, D.A., CHRISTAKUDIS, G., TAYLOR, N.F. (2013). 21-hydroxylase deficiency in the neonate - trends in steroid anabolism and catabolism during the first weeks of life. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **138**, 334-347.
8. PRADER, A., GURTNER, H.P. (1955). Das Syndrom des pseudohermaphroditismus masculinus bei kongenitaler Nebennierenrinden-Hyperplasie ohne Androgenüberproduktion (adrenaler Pseudohermaphroditismus masculinus). *Helvetica paediatrica acta*, **10**(4), 397-412.
9. BUNDESAUSSCHUSS DER ÄRZTE UND KRANKENKASSEN. *Richtlinie des Gemeinsamen Bundesausschusses über die Früherkennung von Krankheiten bei Kindern (Kinder-Richtlinie)* [online], 2017 [Zugriff am: 26. September 2018]. Verfügbar unter: https://www.g-ba.de/downloads/62-492-1537/RL_Kinder_2017-10-19_iK-2018-03-16.pdf
10. NENNSTIEL-RATZEL, U., O. GENZEL-BOROVICZÉNY, H. BÖHLES und ET AL. *S2k Leitlinie: Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselstörungen und Endokrinopathien* [online] [Zugriff am: 25. März 2016]. Verfügbar unter: www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/024-012l_S2k_Neugeborenencreening_2011-12.pdf
11. KULLE, A.E., WELZEL, M., HOLTERHUS, P.-M., RIEPE, F.G. (2013). Implementation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for eight adrenal C-21 steroids and pediatric reference data. *Hormone research in paediatrics*, **79**(1), 22-31.
12. AUCHUS, R.J., LEE, T.C., MILLER, W.L. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *The Journal of biological chemistry*, **273**(6), 3158-3165.
13. KATAGIRI, M., KAGAWA, N., WATERMAN, M.R. (1995). The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Archives of biochemistry and biophysics*, **317**(2), 343-347. ISSN 0003-9861.
14. WILSON, J.D. (2001). The role of 5alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reproduction, fertility, and development*, **13**(7-8), 673-678.

15. AZZOUNI, F., GODOY, A., LI, Y., MOHLER, J. (2012). The 5 alpha-reductase isozyme family: a review of basic biology and their role in human diseases. *Advances in urology*, **2012**, 530121.
16. MARCHETTI, P.M., BARTH, J.H. (2013). Clinical biochemistry of dihydrotestosterone. *Annals of clinical biochemistry*, **50**(Pt 2), 95-107.
17. ANAWALT, B.D. (2017). Is Dihydrotestosterone a Classic Hormone? *Endocrine reviews*, **38**(3), 170-172.
18. SHIRAIISHI, S., LEE, P.W.N., LEUNG, A., GOH, V.H.H., SWERDLOFF, R.S., WANG, C. (2008). Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*, **54**(11), 1855-1863.
19. SWERDLOFF, R.S., DUDLEY, R.E., PAGE, S.T., WANG, C., SALAMEH, W.A. (2017). Dihydrotestosterone: Biochemistry, Physiology, and Clinical Implications of Elevated Blood Levels. *Endocrine reviews*, **38**(3), 220-254.
20. MENDONCA, B.B., BATISTA, R.L., DOMENICE, S., COSTA, E.M.F., ARNHOLD, I.J.P., RUSSELL, D.W., WILSON, J.D. (2016). Steroid 5 α -reductase 2 deficiency. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, **163**, 206-211.
21. SPITZER, M., HUANG, G., BASARIA, S., TRAVISON, T.G., BHASIN, S. (2013). Risks and benefits of testosterone therapy in older men. *Nature reviews. Endocrinology*, **9**(7), 414-424.
22. MÜNZKER, J., HOFER, D., TRUMMER, C., ULBING, M., HARGER, A., PIEBER, T., OWEN, L., KEEVIL, B., BRABANT, G., LERCHBAUM, E., OBERMAYER-PIETSCH, B. (2015). Testosterone to dihydrotestosterone ratio as a new biomarker for an adverse metabolic phenotype in the polycystic ovary syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **100**(2), 653-660. ISSN 0021-972X.
23. WILSON, J.D., SHAW, G., LEIHY, M.L., RENFREE, M.B. (2002). The marsupial model for male phenotypic development. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **13**(2), 78-83.
24. WILSON, J.D., AUCHUS, R.J., LEIHY, M.W., GURYEV, O.L., ESTABROOK, R.W., OSBORN, S.M., SHAW, G., RENFREE, M.B. (2003). 5alpha-androstane-3alpha,17beta-diol is formed in tammar wallaby pouch young testes by a pathway involving 5alpha-pregnane-3alpha,17alpha-diol-20-one as a key intermediate. *Endocrinology*, **144**(2), 575-580. ISSN 0013-7227.
25. AUCHUS, R.J. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **15**(9), 432-438. ISSN 1043-2760.
26. FUKAMI, M., HOMMA, K., HASEGAWA, T., OGATA, T. (2013). Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, **242**(4), 320-329.
27. KAMRATH, C., HARTMANN, M.F., REMER, T., WUDY, S.A. (2012). The activities of 5 α -reductase and 17,20-lyase determine the direction through androgen synthesis pathways in patients with 21-hydroxylase deficiency. *Steroids*, **77**(13), 1391-1397.
28. FLÜCK, C.E., MEYER-BÖNI, M., PANDEY, A.V., KEMPNÁ, P., MILLER, W.L., SCHOENLE, E.J., BIASON-LAUBER, A. (2011). Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *American journal of human genetics*, **89**(2), 201-218. ISSN 0002-9297.
29. PENNING, T.M., JIN, Y., RIZNER, T.L., BAUMAN, D.R. (2008). Pre-receptor regulation of the androgen receptor. *Molecular and cellular endocrinology*, **281**(1-2), 1-8.
30. KAMRATH, C., HOCHBERG, Z.'e., HARTMANN, M.F., REMER, T., WUDY, S.A. (2012). Increased activation of the alternative "backdoor" pathway in patients with 21-hydroxylase deficiency:

- evidence from urinary steroid hormone analysis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **97**(3), E367-75. ISSN 0021-972X.
31. GENECARDS: *The Human Gene Database* [online] [Zugriff am: 25. Februar 2016]. Verfügbar unter: www.genecards.org
 32. MARTI, N. *Establishing the role of the steroid backdoor pathway for androgen biosynthesis in the human ovary*: Barcelona: European Society for paediatric endocrinology.
 33. BIASON-LAUBER, A., MILLER, W.L., PANDEY, A.V., FLÜCK, C.E. (2013). Of marsupials and men: "Backdoor" dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. *Molecular and cellular endocrinology*, **371**(1-2), 124-132.
 34. FREDERIKSEN, D.W., WILSON, J.D. (1971). Partial characterization of the nuclear reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: delta 4-3-ketosteroid 5 alpha-oxidoreductase of rat prostate. *The Journal of biological chemistry*, **246**(8), 2584-2593.
 35. FLÜCK, C.E., MILLER, W.L., AUCHUS, R.J. (2003). The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **88**(8), 3762-3766. ISSN 0021-972X.
 36. KULLE, A.E., RIEPE, F.G., MELCHIOR, D., HIORT, O., HOLTERHUS, P.M. (2010). A novel ultrahigh pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age- and sex-specific reference data. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **95**(5), 2399-2409. ISSN 0021-972X.
 37. COLE, T.J., BELLIZZI, M.C., FLEGAL, K.M., DIETZ, W.H. (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ (Clinical research ed.)*, **320**(7244), 1240-1243.
 38. GROSS, J.H. *Massenspektrometrie. Ein Lehrbuch*. Berlin: Springer(2013. ISBN 978-3-8274-2980-3.
 39. KARAS, M., BAHR, U., DÜLCKS, T. (2000). Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, **366**(6-7), 669-676.
 40. R DEVELOPMENT CORE TEAM. *R: A language and environment for statistical computing*: R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
 41. COHEN, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. Hoboken: Taylor and Francis(2013. ISBN 0-8058-0283-5.
 42. PETTERSSON, K., DELAUNAY, F., GUSTAFSSON, J.A. (2000). Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene*, **19**(43), 4970-4978. ISSN 0950-9232.
 43. REINEHR, T., KULLE, A., WOLTERS, B., LASS, N., WELZEL, M., RIEPE, F., HOLTERHUS, P.-M. (2013). Steroid hormone profiles in prepubertal obese children before and after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **98**(6), E1022-30. ISSN 0021-972X.
 44. FAIMAN, C., WINTER, J.S. (1971). Diurnal cycles in plasma FSH, testosterone and cortisol in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **33**(2), 186-192. ISSN 0021-972X.

7. Anhang

7.1 Varianz und Qualitätskontrolle

Intravarianz

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
DHEA	75 nmol/l	78	3,6	DHT	75 nmol/l	81,256	6,5
	7,5 nmol/l	7,71	7,68		7,5 nmol/l	7,632	5,759
	4 nmol/l	4,367	8,073		4 nmol/l	4,491	5,805
	0,75 nmol/l	0,8455	7,9095		0,75 nmol/l	0,7996	8,5866

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
17-OHP	75 nmol/l	77,86	5,4	Andro- standiol	75 nmol/l	80,76	6,76
	7,5 nmol/l	8,033	7,322		7,5 nmol/l	7,577	4,272
	4 nmol/l	4,505	4,771		4 nmol/l	4,445	9,268
	0,75 nmol/l	0,7545	14,443		0,75 nmol/l	0,7341	12,1484

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
Andro- stendion	75 nmol/l	78,598	4,65	Andro- steron	75 nmol/l	83,01	6,39
	7,5 nmol/l	7,916	5,533		7,5 nmol/l	7,9133	7,989
	4 nmol/l	4,339	10,048		4 nmol/l	4,349	6,457
	0,75 nmol/l	0,7844	8,2832		0,75 nmol/l	0,8021	10,2563

		MW nmol/l	VK %
Testosteron	75 nmol/l	76,46	3,95
	7,5 nmol/l	7,5407	4,534
	4 nmol/l	4,257	6,027
	0,75 nmol/l	0,719	10,6232

Intervarianz

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
DHEA	75 nmol/l	76,53	2,71	DHT	75 nmol/l	74,08	2,87
	7,5 nmol/l	7,4	11,3		7,5 nmol/l	7,73	4,2
	4 nmol/l	4,418	7,19		4 nmol/l	4,14	9,86
	0,75 nmol/l	0,7946	7,0524		0,75 nmol/l	0,768	11,7227

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
17-OHP	75 nmol/l	77,37	2,82	Andro- standiol	75 nmol/l	76,6	4
	7,5 nmol/l	7,61	3,9		7,5 nmol/l	7,95	2,98
	4 nmol/l	4,2	9,84		4 nmol/l	4,48	13,29
	0,75 nmol/l	0,7148	10,5711		0,75 nmol/l	0,82	5,5902

		MW nmol/l	VK %			MW nmol/l	VK %
Andro- stendion	75 nmol/l	76,63	1,39	Andro- steron	75 nmol/l	78,5	9,32
	7,5 nmol/l	7,62	6,74		7,5 nmol/l	7,86	9,78
	4 nmol/l	4,33	12,66		4 nmol/l	4,13	15,97
	0,75 nmol/l	0,7468	18,5562		0,75 nmol/l	0,756	12,9511

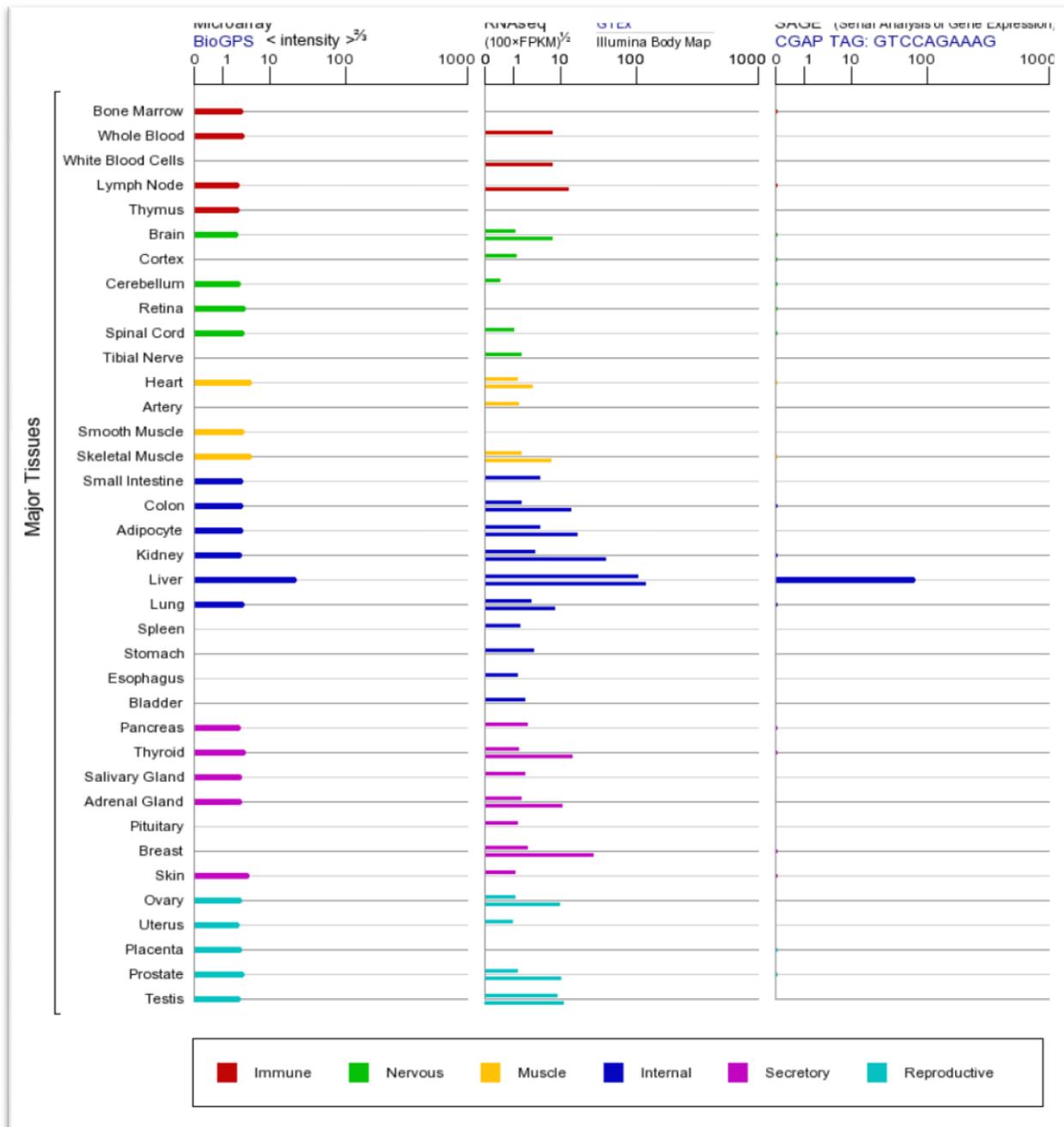
		MW nmol/l	VK %
Testosteron	75 nmol/l	77,53	4,22
	7,5 nmol/l	7,89	6,77
	4 nmol/l	4,73	9,85
	0,75 nmol/l	0,7992	14,1453

7.2 Expressionsdaten der BP-Enzyme

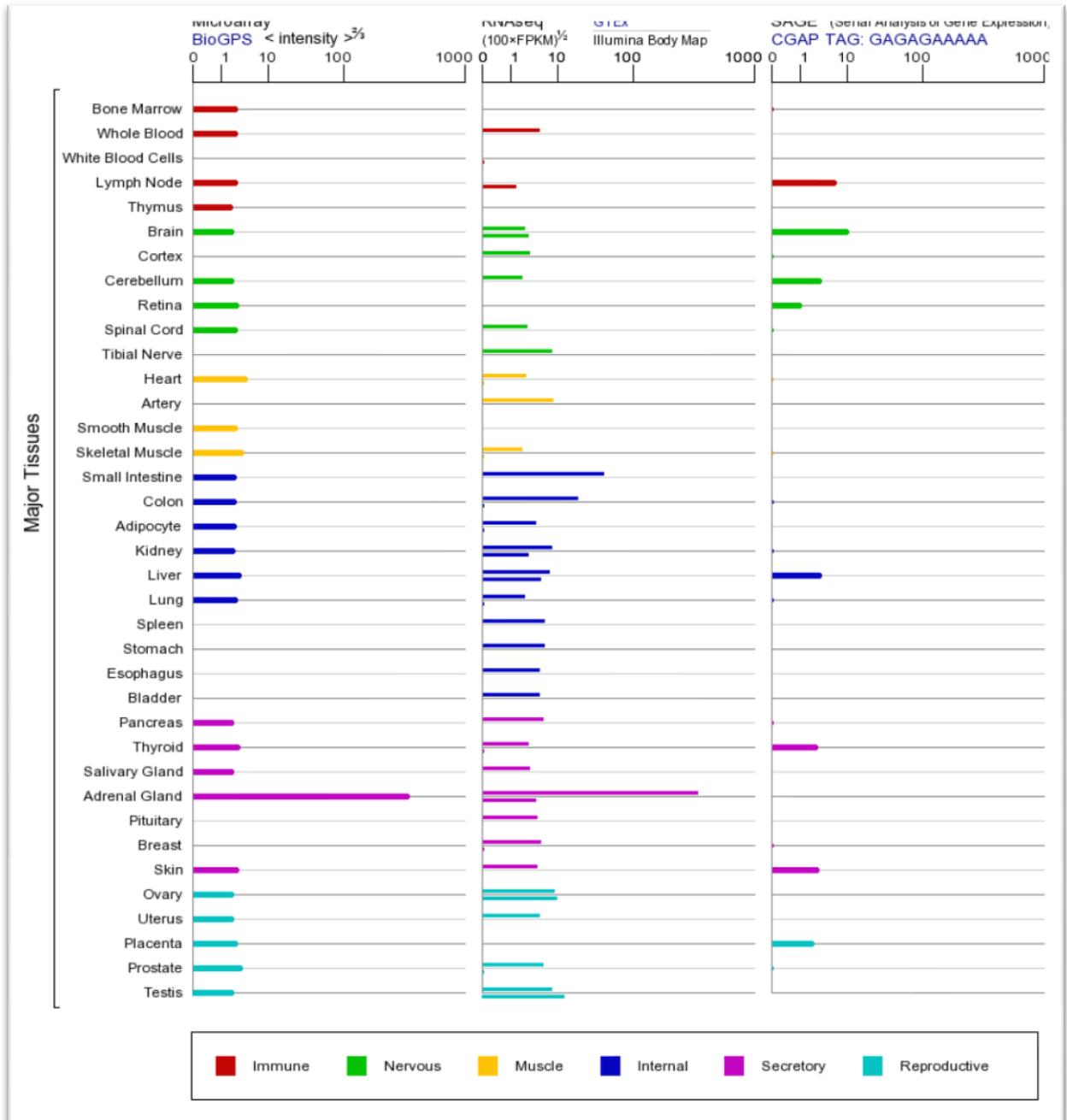
[1] AKR1C2 (31)



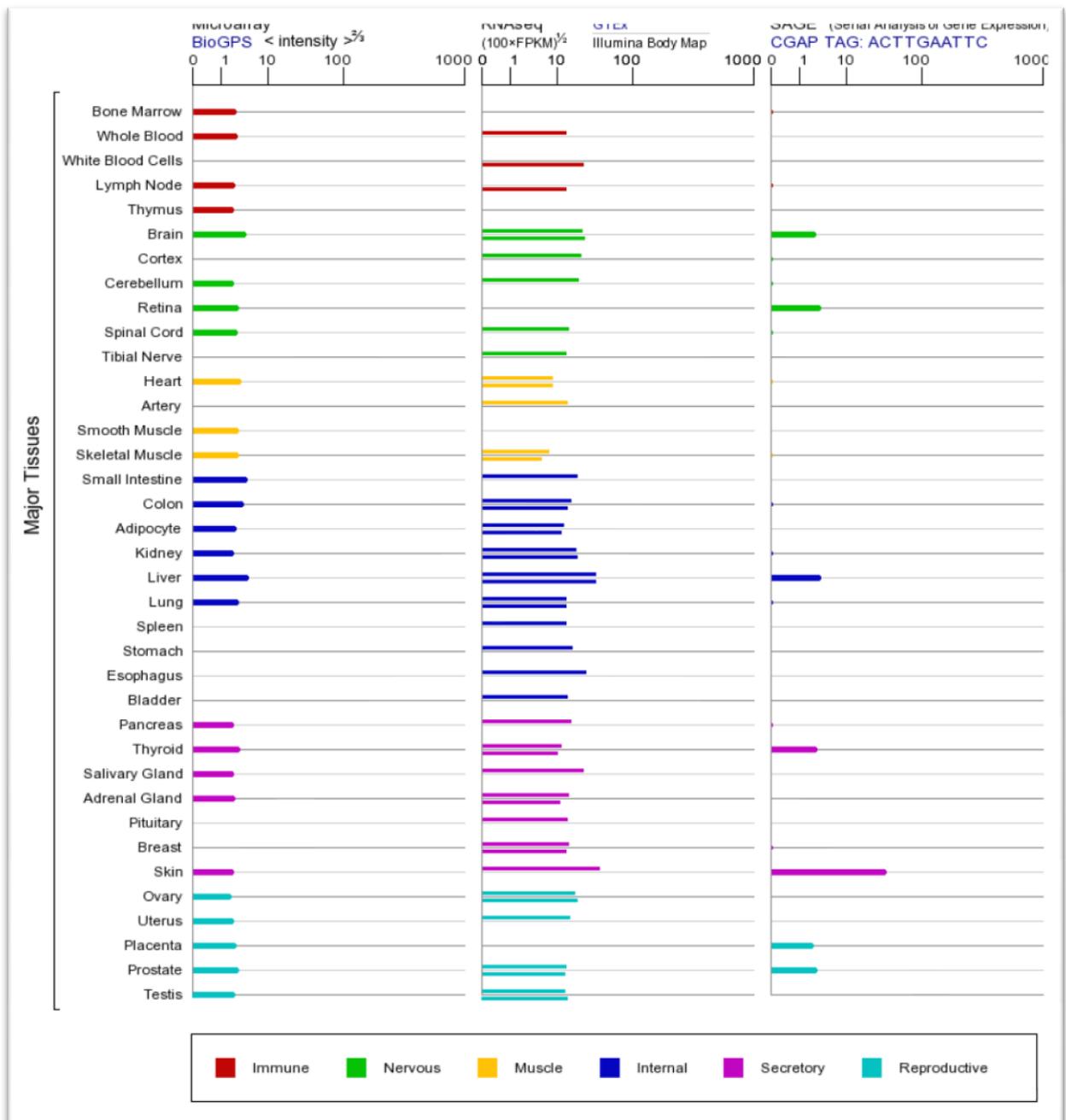
[2] AKR1C4 (31)



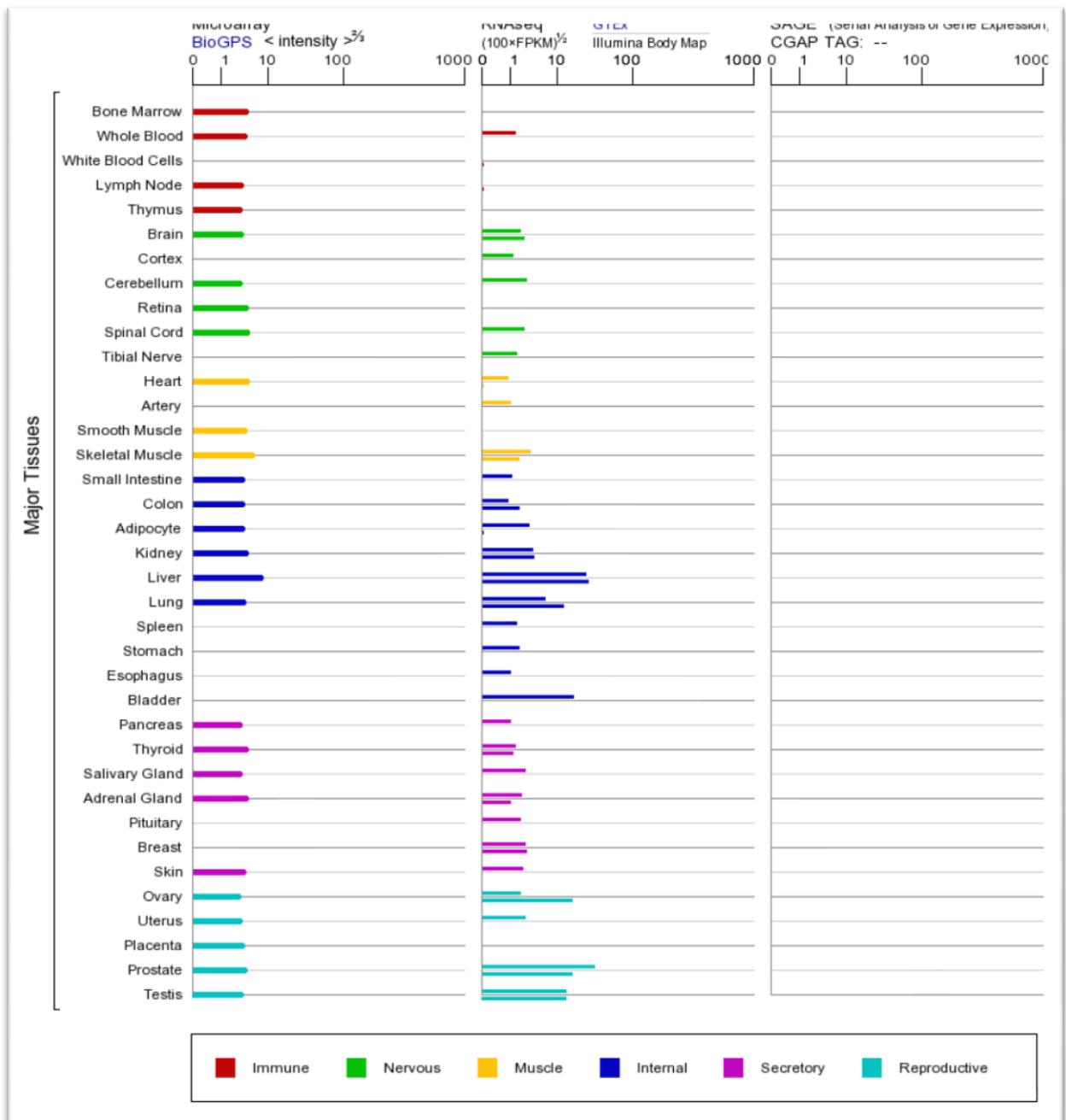
[3] HSD3B2 (31)



[4] SRD5A1 (31)



[5] SRD5A2 (31)



7.3 Messergebnisse der Steroide und Hormone des klassischen Weges

Vergleich der 17-OHP-, Androstendion-, Testosteron- und 21-Desoxycortisol-Plasmakonzentrationen in nmol/l der Kontrollen und 21-OHD Patientinnen und Patienten getrennt nach Geschlecht. Die Tabelle zeigt dabei die kleinsten Werte, die größten Werte und den Mittelwert der Hormonkonzentrationen des klassischen $\Delta 5$ -Weges des jeweiligen Kollektivs. Außerdem sind die p-Werte zwischen den Kontrollen und den 21-OHD-Patientinnen und Patienten dargestellt.

Vergleich Kontrollen und 21-OHD		17 OHP nmol/l				Testosteron nmol/l			
Kollektiv	Geschlecht	MW	Min	Max	p-Wert	MW	Min	Max	p-Wert
Kontrollen	Jungen	0,95	0,01	4,46	<0,0001	6,60	0,02	48,88	0,1885
21-OHD	Jungen	112,75	0,01	1193,90		3,39	0,02	31,03	
Kontrollen	Mädchen	1,54	0,12	8,59	<0,0001	0,63	0,02	2,64	0,0008
21-OHD	Mädchen	168,46	0,01	955,84		2,44	0,02	28,50	
Vergleich Kontrollen und 21-OHD		Androstendion nmol/l				21-Desoxycortisol nmol/l			
Kollektiv	Geschlecht	MW	Min	Max	p-Wert	MW	Min	Max	p-Wert
Kontrollen	Jungen	0,83	0,04	5,25	0,0003	0,4615	0,1	1,8	<0,0001
21-OHD	Jungen	8,99	0,04	151,4		21,15	0,01	195	
Kontrollen	Mädchen	1,47	0,04	5,79	<0,0001	0,1	0,1	0,1	<0,0001
21-OHD	Mädchen	17,28	0,04	290,1		45	0,05	664,1	

7.4 Ethikantrag

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik - Schwennentweg 20 - 24105 Kiel

Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus
UKSH Campus Kiel
Klinik für Allgemeine Pädiatrie,
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 9
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 20. September 2016

AZ: D 531/16 (bitte stets angeben)

Studienplan: Untersuchung von Steroidbiosynthesewegen per Massenspektrometrie aus Restmaterial ehemals diagnostischer Routineproben des Kinderendokrinologischen Labors einschl. biomathematischer Auswertung bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen

Studienleiter: Anschreiben und Projektbeschreibung v. 02.08.16
Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, UKSH Campus Kiel

Erst-Antrag: 02. August 2016 (Eingang: 03. August 2016)

Überarbeitung: 14. September 2016 (Eingang: 20. September 2016)

Sehr geehrter Herr Kollege Holterhus,

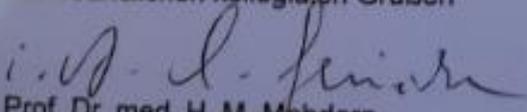
wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

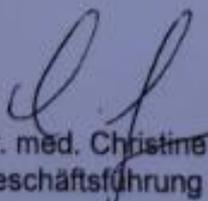
Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung des Projektes viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.5 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Paul-Martin Holterhus, meinem Doktorvater, für die Eröffnung und Überlassung der Thematik, für die freundliche Betreuung dieser Arbeit und für die hilfreichen Diskussionen während regelmäßiger Besprechungen, die zur kritischen Auseinandersetzung und zur konstruktiven Entwicklung dieser Arbeit geführt haben.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Dr. Alexandra Kulle für ihre unendlich hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung bedanken. Zu jeder Zeit stand sie mir mit kompetentem Rat und Hilfestellung bei der Literaturrecherche, der technischen Durchführung, der statistischen Auswertung sowie der Entwicklung dieser Doktorarbeit zur Seite. Ohne ihre intensive, engagierte und warmherzige Begleitung wäre ein eigenständiges Arbeiten und die Bearbeitung dieses komplexen Themas nicht möglich gewesen. Unverzichtbar waren ihre zahlreichen Ideen, ihre Erfahrung und ihre konstruktive Kritik.

Darüber hinaus gilt mein Dank dem gesamten Team des kinderendokrinologischen Labors des Hormonzentrums für Kinder und Jugendliche am UKSH Campus Kiel, vor allem den medizinisch technischen Assistentinnen und Assistenten der Diagnostik und Forschung, die mir mit viel Geduld und immer einem offenen Ohr bei der praktischen Laborarbeit neben dem Routinebetrieb zur Seite standen. Frau Tanja Stampe sei in diesem Rahmen besonders erwähnt.

Ferner möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die emotionale Unterstützung danken. Ihr Beistand gab mir die Motivation zur Vollendung meiner Dissertation.

7.6 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Helena Kristina Wulf, geboren am 20.06.1988 in Würzburg, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch nicht an anderer Stelle vorgelegen hat.

Datum, Unterschrift

7.7 Veröffentlichungen

JA-PED 2016 (gemeinsame Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinderendokrinologie und -diabetologie e.V. (DGKED) und der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Diabetologie e.V. (AGPD)) in Osnabrück, 11.11.-13.11.2016

Abstract (ID 26) und Poster mit dem Titel:

Entwicklung einer LC-MS/MS Methode zur Bestimmung der Backdoorpathway (BP) Hormone Androsterone (Asterone) und Androstandiol (Adiol) im Plasma mit retrospektiver Analyse eines Referenzkollektivs und einer AGS Kohorte.

Wulf H.K.¹, Kulle A.E. ¹, Holterhus P.-M. ¹

¹Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Klinik für allg. Pädiatrie, Kiel, Deutschland

HK Wulf¹, AE Kulle¹, PM Holterhus¹

¹Universitätsklinikum Schleswig-Holstein / Campus Kiel, Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Schwanenweg 20, 24105 Kiel
E-mail: wulfkristina@hotmail.com

Zusammenfassung:

Backdoorpathway (BP) Steroide sind im kindlichen Plasma des Referenzkollektivs und in der AGS Kohorte (21-Hydroxylasemangel, 21-OHD) messbar. Beim AGS finden sich insbesondere signifikant erhöhte Androstandiolkonzentrationen. Ebenso ist DHT beim AGS im Plasma höher konzentriert als im Referenzkollektiv. BP-Steroide könnten in Zukunft das AGS-Monitoring ergänzen. Hierzu sind klinische Studien erforderlich.

Einleitung:

Die Parameter 17-OH Progesteron (17-OHP), Androstendion und Testosteron im Plasma beschreiben nur unzureichend die Therapieeinstellung des 21-OHD AGS. Insbesondere findet das hochpotente DHT bei der AGS-Diagnostik bisher kaum Berücksichtigung. Dieses kann sowohl über Testosteron als auch über den sogenannten BP (Adiol und Asteron) unter Umgehung der klassischen Androgene entstehen. Eine hohe Affinität von 17-OHP zur 5 α -Reduktase1 kann zur vermehrten DHT-Bereitstellung bei 21-OHD über den BP beitragen.

Ziel:

1. Entwicklung einer neuen LC-MS/MS-basierten Methode zur parallelen Bestimmung von Asteron und Adiol im Plasma
2. Nachweis in einem Referenzkollektiv und in einem 21-OHD Kollektiv
3. Korrelation von BP-Steroidkonzentrationen mit klinischen Daten

Kollektiv:

Kohorte:

- Referenzkollektiv (Ref): 68 Kinder (10 Mädchen, 58 Jungen); 1-16 Jahre
 - AGS mit 21-OHD (AGS): 124 Kinder (49 Mädchen, 75 Jungen); 0-19 Jahre
- davon Neudiagnosen (ND): 21 Kinder (12 Mädchen, 9 Jungen)
unter Therapie (P): 103 Kinder (37 Mädchen, 66 Jungen)

Methode:

Methodenentwicklung:

- 0,1 ml Plasma bzw. Serum
- Interner Standard: 5 β -Androstan-3 α ,17 β -diol-2,2,3,4,4-d5
- Festphasenextraktion (SPE) und LC-MS/MS-Massenspektrometrie mit MAX Elutionsplatte (Waters, USA)

Festphasenextraktion (SPE)

- Konditionierung mit MeOH / H₂O
- Auftragen der Probe
- 2 Waschstschritte: 5% NH₄OH Lösung / 10% MeOH
- Elution mit Isopropanol

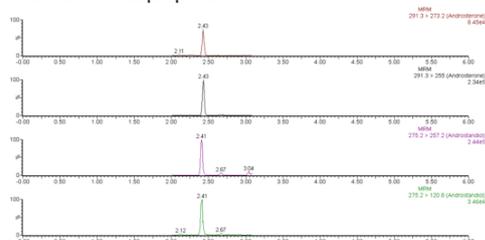


Fig. 1:
Chromatogramm
Androstandiol
und Androsteron

Ergebnisse I: Werte

BP-Steroide sind sowohl beim Normalkollektiv als auch bei 21-OHD messbar. 21-OHD Patienten weisen insbesondere erhöhte Androstandiolkonzentrationen ($p < 0,0002$) auf, beim Androsteron sind die Unterschiede derzeit weniger deutlich. Fig. 2 stellt nur die männlichen Patienten dar.

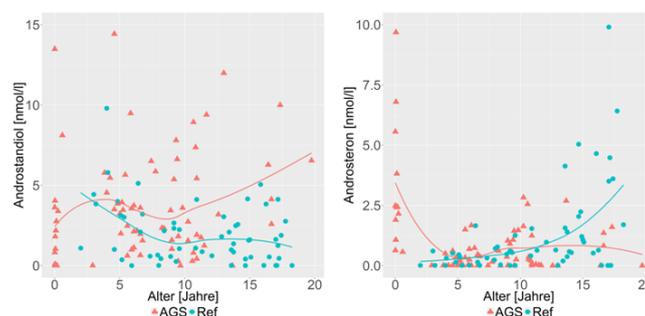
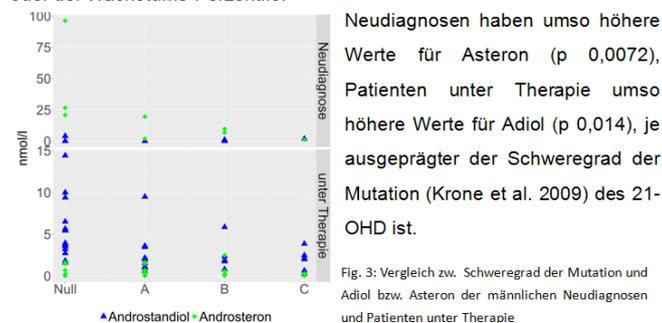


Fig. 2: Adiol und Asteron; männliches Referenzkollektiv und männliche 21-OHD Patienten im Vergleich nach Alter

Ergebnisse II: klinische Daten

Es gibt keine Korrelation zwischen BP-Steroiden und dem Alter, der BMI- oder der Wachstums-Perzentile.



Neudiagnosen haben umso höhere Werte für Asteron ($p < 0,0072$), Patienten unter Therapie umso höhere Werte für Adiol ($p < 0,014$), je ausgeprägter der Schweregrad der Mutation (Krone et al. 2009) des 21-OHD ist.

Fig. 3: Vergleich zw. Schweregrad der Mutation und Adiol bzw. Asteron der männlichen Neudiagnosen und Patienten unter Therapie

Ergebnisse III: Auswertung DHT

21-OHD Patienten haben signifikant höhere Plasmakonzentrationen von DHT als das Normalkollektiv ($p < 0,001$ – alterskorrigierter p-Wert).

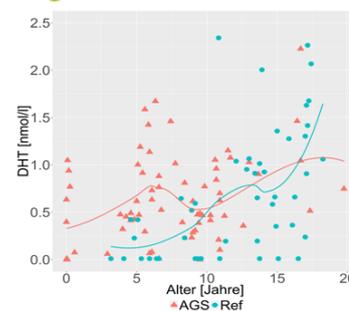


Fig. 4: DHT Vergleich männliche Referenzpatienten und 21-OHD nach Alter