

Untersuchungen zur normalen und pathologischen Steuerung der Nebennierenrinden-Androgene im Kindesalter

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Pädiatrie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. Dagmar l'Allemand-Jander

geboren am 11.12.1957 in Berlin

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 28.1.2003

Datum der Habilitation: 17.7.2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Helmut-Günther Dörr, Universitäts-Kinderklinik, Erlangen
 2. Prof. Dr. med. Martin Reincke, Med. Klinik II der Universität, Freiburg

Abstract	7
Abkürzungsverzeichnis	8
Als Grundlage dienende eigene Publikationen I - VI	9
1 Einleitung	10
1.1 Altersabhängigkeit von Nebennierenrinden-Morphologie und Funktion	10
1.2 Bedeutung der NNR-Androgene	11
1.3 NNR-Androgen-Synthese und Metabolisierung	13
1.3.1 Zonen- und Organ spezifische Androgen-Synthese beim Menschen:	13
1.3.2 Enzymaktivität und Regulation durch Coenzymkonzentration	16
1.3.3 Metabolisierung in NNR und Peripherie	16
1.4 Regulation der NNR-Androgenbildung – bisheriger Kenntnisstand	17
1.4.1 Regulationsprinzip	17
1.4.2 Regulation durch hypophysär-hypothalamische Hormone	18
1.4.2.1 ACTH	18
1.4.2.2 CASH und andere POMC-Derivate	19
1.4.3 NNR-Regulation durch nicht-hypophysäre Faktoren	19
1.4.3.1 Insulin	19
1.4.3.2 Leptin und Adipositas	20
1.4.3.3 Einfluss anderer Steroide auf die Enzymaktivität	20
1.4.4 Intraadrenale Regulation	20
1.4.4.1 Neuroendokrine und parakrine Regulation adrenocorticaler Zellen	20
1.4.4.2 IGF-I und -II	20
1.4.5 TGFβ1	22
1.4.6 Zusammenfassung des bisherigen Kenntnisstandes zur Regulation der NNR-Androgene	22
1.5 Adrenarche	22
1.6 Prämatüre Adrenarche	23
1.6.1 Definition	23
1.6.2 Vorkommen	24
1.6.3 Ursachen und Diagnostik	24
1.6.4 Prognose	25
1.6.5 Adipositas und Einfluss auf die Adrenarche	26
1.7 Fragestellung	27
2 In vitro-Untersuchungen: Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen auf die Steroidsekretion von humanen NNR-Zellen in Primärkultur (Publikationen I [180] und II [179])	28
2.1 Methoden	28
2.1.1 Primärzellkultur unter chemisch definierten Bedingungen	28
2.1.2 Qualitative und quantitative Zellauswertung	30
2.1.3 Steroidhormonbestimmungen	32
2.1.4 IGF- Bestimmungen	32
2.1.5 IGF-Bindungsprotein-Nachweis	32
2.1.6 Gesamt-RNA Extraktion und –Bestimmung	32

2.1.7	Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot	33
2.1.8	Statistische Auswertung	33
2.2	Ergebnisse	34
2.2.1	Endokrine Regulation der Steroidsynthese (Publikation I [180])	34
2.2.1.1	Kontrollen und ACTH-behandelte Zellen	35
2.2.1.2	Wirkungen von IGF-I	37
2.2.1.3	Altersabhängigkeit der IGF-I-Effekte	38
2.2.1.4	Wirkungen des IGF-II	39
2.2.1.5	Insulin-Wirkungen	39
2.2.1.6	Wachstumshormon-Wirkung	40
2.2.2	Autokrines IGF-System der NNR (Publikation II [179])	40
2.2.2.1	Sekretion von IGF-I und II	40
2.2.2.2	Nachweis der IGF- mRNAs	40
2.2.2.3	Spezifische Bindung von IGF-I	41
2.2.2.4	Sekretion und Bedeutung von IGF-Bindungsproteinen	41
3 Beziehungen zwischen NNR-Androgenen und Körpermasse bei gesunden und adipösen Kindern und Jugendlichen (Publikation III [181])		45
3.1	Methoden	45
3.2	Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und BMI, IGF-I sowie Leptin bei präpubertären Kindern. 46	
3.3	Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und BMI, IGF-I sowie Leptin bei pubertären Kindern und Jugendlichen.	49
4 Androgenerhöhung trotz hypothalamischen Defektes beim Prader-Labhart-Willi-Syndrom (Publikation IV [172])		52
4.1	Methoden	52
4.2	Klinische und hormonelle Parameter bei PWS vor und unter Wachstumshormontherapie	54
4.3	Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und Körperzusammensetzung, IGF-I, Insulin sowie Leptin beim PWS	55
5 Ursachen und Folgen der Prämaturen Adrenarche (Publikation V [178], Publikation VI [182] und Publikation III [181])		58
5.1	Methoden	58
5.2	Ergebnisse der Hormonuntersuchungen und Diagnosestellung	60
5.2.1	17-Hydroxy-Progesteron	60
5.2.2	DHEAS	61
5.2.3	Δ 5-Pregnenolon (Preg) und 17-OH- Δ 5-Pregnenolon (17-OHPreg)	62
5.2.4	Testosteron	63
5.2.5	Androstendion	65
5.3	Differentialdiagnosen der Prämaturen Pubarche	65
5.3.1	NNR-Tumoren	65
5.3.2	21-Hydroxylase-Mangel (Publikationen V [178, 182] und VI [178, 182])	65
5.4	Charakterisierung der Subgruppen der PA	66
5.4.1	Klinische und biochemische Besonderheiten bei Manifestation	66
5.4.2	Verlauf der auxologischen Parameter	68
5.5	Nachuntersuchung der Mädchen mit PA – Unterschiede zwischen den Subgruppen?	70
5.6	Einfluss von Adipositas und Leptin bei PA (Publikation III [181])	71

6 Diskussion	74
6.1 In-vitro-Untersuchungen	74
6.1.1 Hormonwirkungen auf die adrenale Androgenbildung	74
6.1.2 Bedeutung des autokrinen adrenalen IGF-Systems	74
6.2 IGFs im Modell der Steuerung der adrenalen Androgenbildung beim Menschen	75
6.3 Zusammenhänge zwischen Körperzusammensetzung und Androgenspiegeln	76
6.4 Das Prader-Willi-Syndrom als Modell der NNR-Androgen-Regulation über Mediatoren der Körperzusammensetzung	78
6.5 Steuerung der physiologischen Adrenarche	79
6.6 Ursachen der Prämaturen Pubarche	80
6.6.1 Organische und genetische Defekte als Ursache der Prämaturen Pubarche	80
6.6.1.1 Tumoren	80
6.6.1.2 Nicht-klassisches AGS bei NNR-Enzymdefekten	80
6.6.2 Mögliche Differentialdiagnosen bei Prämaturer Adrenarche	81
6.6.2.1 Manifestation bei Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Mangel	81
6.6.2.2 Exaggerated Adrenarche bzw. 3 β -HSD-Insuffizienz	82
6.6.2.3 Adipositas	83
6.7 Konsequenzen aus der Berliner Nachbeobachtung für Diagnostik und Therapie bei PA	84
6.7.1 Wachstum und Endgrösse	84
6.7.2 Hirsutismus	84
6.7.3 Ovarialfunktion	85
7 Schlussfolgerungen und Hypothesen	87
Literaturverzeichnis	88
Danksagung	107
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	108

ZUSAMMENFASSUNG

Die Reifung der Zona reticularis der Nebennieren-Rinden (NNR) und ihrer Androgen-Sekretion vor der Pubertät unterscheidet sich bei Menschen und höheren Primaten von der NNR-Reifung anderer Species, z.B. der Nager. Die Sekretion der NNR-Androgene leitet die Pubertätsentwicklung ein. Die NNR-Androgene erlangen medizinische Bedeutung dadurch, dass sie bei Frauen zu Hirsutismus und Fertilitätsstörungen führen können. Neben diesen Symptomen stellen sie einen Risikofaktor für die Entwicklung eines Polycystischen-Ovar-Syndroms (PCOS) dar, das ungefähr 7 % der prämenopausalen Frauen betrifft. Lange Zeit war nicht bekannt, wie die Differenzierung der Zona reticularis beim Menschen reguliert wird. Sicher ist ACTH bei weitem das bedeutsamste übergeordnete Hormon für die globale adrenocorticale Differenzierung und Funktion. Weitere Faktoren sind speziell für die Androgensekretion verantwortlich, aber nicht genau definiert. Nun wurde zunächst in zellbiologischen Experimenten belegt, dass die ACTH-Wirkung durch ein Spezies-spezifisches Muster von Wachstumsfaktoren autokrin moduliert wird und so die postnatale Entwicklung der Nebenniere steuern kann. Die vorliegenden Untersuchungen an menschlichen NNR-Zellen von Kindern und Erwachsenen in Primärkultur zeigen erstmals, dass IGF-I und IGF-II differenzierte Funktionen dieser Zellen aufrecht erhalten. IGF-I und, mehr noch, IGF-II steigern die Steroid-Biosynthese und ACTH-Ansprechbarkeit, und sie fördern die Bildung von Androstendion, einem Δ_5 -Androgen der Zona reticularis. Darüberhinaus bewirkt Insulin in physiologischen sowie in micromolaren Konzentrationen den IGFs ähnliche Änderungen der Steroidsynthese. In Querschnittsuntersuchungen an gesunden Kindern vor der Pubertät sowie Kindern mit einfacher Adipositas konnte gezeigt werden, dass die Körperzusammensetzung mit den NNR-Androgenen zusammenhängt. Über die Mediatoren IGF-I, Insulin und Leptin wird offensichtlich der NNR der Zustand von Gewicht und Wachstum des Kindes signalisiert, auch bei pathologischer Körperzusammensetzung, wie dem Prader-Willi-Syndrom. Während die Adipositas die Androgen-Bildung steigern kann, ist sie jedoch selbst nicht der kausale Faktor einer vorzeitigen Nebennierenrindenreifung. Der Prämaturen Pubarche können in 5 - 10 % der untersuchten weiblichen Population ein nicht-klassisches AGS oder NNR-Tumoren zugrunde liegen. Bei den verbleibenden Kindern besteht eine eigentlich harmlose Reifungsbeschleunigung mit normaler Wachstumsprognose. Betrachtet man diese Kinder mit idiopatischer Prämaturer Adrenarche jedoch genauer, so finden sich zwei Untergruppen mit langfristigen Risiken: erstens zeigen Kinder mit einer sogenannte manifesten Heterozygotie für einen 21-Hydroxylase-Defekt Auffälligkeiten des Wachstums, die eine Endgrößenreduktion bewirken könnten, und zweitens wird bei Jugendlichen mit einer Überstimulierbarkeit der NNR diese „Exaggerated Adrenarche“ für ein nachfolgendes PCOS verantwortlich gemacht. Schliesslich scheint es vor dem Hintergrund der sich epidemieartig ausbreitenden Zunahme des Übergewichts im Kindesalter angezeigt, den Bezug dieser NNR-Störungen zur Adipositas und der Hyperinsulinämie weiter zu klären.

Schlagworte:

Nebennierenrinden-Androgene, DHEAS, Androstendion, Adrenarche, Prämatüre Adrenarche, IGF-I, IGF-II, Insulin

ADRENAL ANDROGENS: EXAMINATION OF THEIR NORMAL AND PATHOLOGICAL REGULATION DURING CHILDHOOD.

Abstract

The prepubertal maturation of the zona reticularis of the adrenal cortex and its androgen secretion in man and higher primates differs from other species, e.g. rodents. The secretion of adrenal androgens induces the pubertal development. The importance of adrenal androgens is derived from them being the cause for hirsutism and fertility disorders in women. In addition they represent a risk factor for the development of the polycystic ovary syndrome (PCOS), that affects about 7% of all pre-menopausal women. The regulation of the differentiation of the zona reticularis was unknown for a long time. However, ACTH is by far the most important hormone to regulate the global adrenocortical differentiation and function. In addition, other yet undefined factors are specifically responsible for the secretion of adrenal androgens. The cell-biological experiments presented here demonstrate that the effects of ACTH can be modulated in an autocrine manner by a species-specific pattern of growth factors so as to allow for the control of the postnatal development of the adrenal gland. The present investigations in human adrenocortical cells of children and adults in primary culture show for the first time that IGF-I and IGF-II maintain the differentiated function of these cells. IGF-I and to an even greater extent IGF-II enhance the biosynthesis of steroids and ACTH-responsiveness, and they promote the production of androstenedione, a Δ^5 -androgen of the zona reticularis. Moreover, insulin, in physiological as well as in micromolar concentrations, induces changes in steroid production similar to the IGFs. In cross-sectional studies of healthy pre-pubertal children and children with simple obesity, it was shown that body composition is associated with adrenal androgens. Mediated by IGF-I, insulin and leptin, body composition apparently signals the child's state of weight and growth to the adrenals, even in patients with abnormal body composition, e.g. the Prader-Willi syndrome. While obesity may enhance androgen production, it is not the direct causal factor to induce premature adrenal maturation. In 5–10% of the female population investigated, premature pubarche is caused by non-classical adrenal hyperplasia or an adrenocortical tumour. In the remaining children, there is merely a harmless acceleration of maturation with normal growth prediction. A closer look at the children with idiopathic premature adrenarche, however, reveals two subgroups with long-term risks: First, children with a so called manifest heterozygosity of a 21-hydroxylase-defect show growth abnormalities, possibly reducing final height. Second, in adolescents with enhanced stimulation of the adrenal cortex, this 'exaggerated adrenarche' is held responsible for the subsequent development of PCOS. Finally, with regard to the rapidly spreading epidemic of overweight in children, it seems essential to study into greater depth the relationship between these adrenal dysfunctions and obesity or hyperinsulinism.

Keywords:

Adrenal Androgens, DHEAS, Androstenedione, adrenarche, premature adrenarche, IGF-I, IGF-II, insulin

Abkürzungsverzeichnis

AD	Androstendion
AGS	Adrenogenitales Syndrom
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
BMI	Body Mass Index (Gewicht in kg / Länge in m ²)
CASH	Cortical Androgen Stimulating Hormone
CYP	Gen eines Cytochrom p450-Enzyms
CYP11B1	11beta-Hydroxylase-Gen
CYP17	17 α -Hydroxylase-Gen
CYP21	21-Hydroxylase-Gen
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteron- Sulfat
GH	Growth hormone, Wachstumshormon
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP	Insulin-like Growth Factor Bindungs-Protein
LO-21-OHD	Late-onset 21-Hydroxylase-Mangel, bzw. nicht-klassisches AGS
m	männlich
NNR	Nebennierenrinde
21-OH	21-Hydroxylase
17-OHP	17-Hydroxyprogesteron
17-OH-Preg.	17-Hydroxy-Pregnenolon
PCOS	Polycystisches-Ovar-Syndrom
POMC	Proopiomelanocortin
PWS	Prader-Labhart-Willi-Syndrom
res	Residuum des entsprechenden Wertes, s. Kapitel 3.1.
r_{Pea}	Pearsons Korrelations-Koeffizient
R^2	Quadrat von r_{Pea} , gibt den Anteil der Variabilität der abhängigen Variablen an, der durch die unabhängige Variable erklärt wird
SD	Standard Deviation
SDS	Standard Deviation Score
w	weiblich

Als Grundlage dienende eigene Publikationen I - VI

- I l'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Baehr V, Oelkers W, Saez JM: Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3892-3897.
- II l'Allemand D, Penhoat A, Blum W, Saez JM: Is there a local IGF-system in human adrenocortical cells? *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:169-173.
- III l'Allemand D, Schmidt S, Rousson V, Brabant G, Gasser T, Grüters A: Associations between body mass, leptin, IGF-I and circulating adrenal androgens in children with obesity and premature adrenarche. *Eur J Endocrinol* 2002;146:537-543.
- IV l'Allemand D, Eiholzer U, Rousson V, Girard J, Blum WF, Torresani T, Gasser T: Increased adrenal androgens in Prader-Willi syndrome (PWS) are associated with insulin, IGF-I and leptin, but not with measures of obesity. *Horm Res* 2002;58:215-222.
- V l'Allemand D, Keller E, Hoepfner W, Serban A, Morel Y, Grüters A: Nonclassical adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase-deficiency: does genotyping predict the clinical manifestation? *Endocr Res* 1996;22:735-739.
- VI l'Allemand D, Tardy V, Grüters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y: How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4562-4567.

1 Einleitung

1.1 Altersabhängigkeit von Nebennierenrinden-Morphologie und Funktion

Die menschliche Nebenniere (NN) ist ein komplex aufgebautes Organ, dessen Zonen unterschiedliche Herkunft und Funktionen aufweisen: als erster NN-Anteil entsteht die fetale Zone in der 4. Gestationswoche aus Mesothel-Zellen und produziert in utero grosse Mengen von NNR-Androgenen, insbesondere des Dehydroepiandrosteron (DHEA) und seines Sulfates DHEAS. Sie erreicht ihre maximale Grösse nach dem 4. Gestationsmonat und bildet sich postpartal in den ersten vier Lebensmonaten zurück [66]. Aus der adulten Zone der fetalen NNR, die nach der 5. Gestationswoche aus Mesenchymzellen entsteht; entwickelt sich zunächst die Zona fasciculata. Sie bildet hauptsächlich Glukokortikoide, welche zur Stressreaktion und Energiebereitstellung beitragen. Aussen, an der Bowmannschen Kapsel, die dem Mesonephros entstammt, haften die Zellen der Zona glomerulosa an, welche Aldosteron produzieren und an der Regulation des Salz-Wasser-Haushaltes beteiligt sind. Das Mark wird nach der 6. Gestationswoche aus von extern einwandernden Zellen des Neuralrohres gebildet [74], und ist aufgrund der Bildung von Katecholaminen befähigt, auf akuten Stress zu antworten.

Die anschliessende Zona reticularis, die an der braunen Färbung durch das Lipofuscin in den sekundären Lysosomen leicht erkennbar ist, bildet sich frühestens im 3. Lebensjahr aus [66] und ist für die Synthese der NNR-Androgene verantwortlich. Diese stehen im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

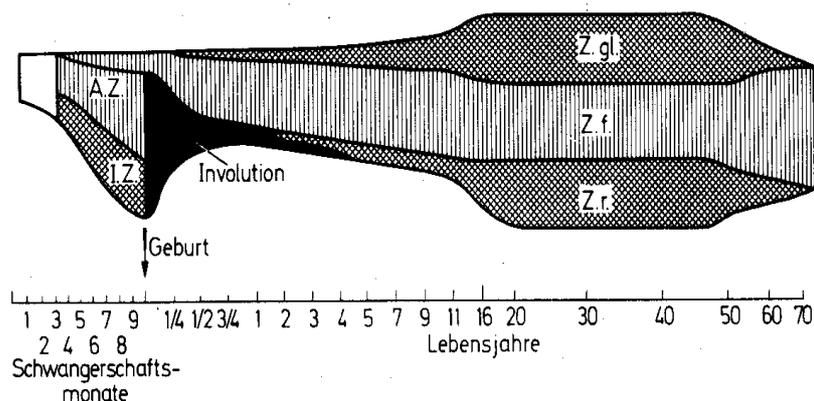


Abb. 1. Lebenskurve der Nebennierenrinde (nach: BARGMANN, 1956, aus: LABHART, 1971). A.Z. und I.Z. = Außen- und Innenzone der fetalen Rinde. Z. gl. = Zona glomerulosa; Z. f. = Zona fasciculata; Z. r. = Zona reticularis.

Abbildung 1: Involution der fetalen NNR. Die gedachte Ordinate zeigt die relative Breite der Zonen an.

Bei Geburt wiegen beide NN zusammen ca. 10 g. Auch bei Erwachsenen liegt das NN-Gewicht in diesem Bereich, die NN können aber proportional zur fettfreien Körpermasse noch grösser werden [66]. Die NNR ist altersspezifischen Veränderungen der androgenbildenden Zonen unterworfen. Während die Glukokortikoid-Regulation von der frühen Kindheit bis ins Alter gleich bleibt [341], unterliegt die Bildung adrenaler Androgene altersabhängigen Veränderungen. Nach dem 3. Lebensjahr werden Androgene zunächst aus einzelnen Inseln in der Zona reticularis gebildet. Diese konfluieren ab dem 6. Lebensjahr und leiten die Pubertätsentwicklung ein. Nach dem 7. Lebensjahr werden die wichtigsten NNR-Androgene, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und sein Sulfat vermehrt und ohne Geschlechtsunterschied gebildet, und steigen während der Pubertät bis zum 20.-30. Lebensjahr an [59, 70, 166]. Erst nach dem 15. Lebensjahr liegen die Werte bei Männern höher [70]. Gleichartig

verhält sich Androstendion, es steigt aber später und in deutlich geringerem Ausmass an [70, 166, 298]. Die NNR-Androgene sinken danach mit zunehmenden Alter ab (Adrenopause, Review in [4]), ebenso wie die Zona reticularis an Breite abnimmt [248]. Androgene werden in jeder Phase durch ACTH stimuliert, doch nimmt ihre Stimulierbarkeit in Relation zu Cortisol nach dem 7. Lebensjahr zu [70], und in der Seneszenz ab [4, 128].

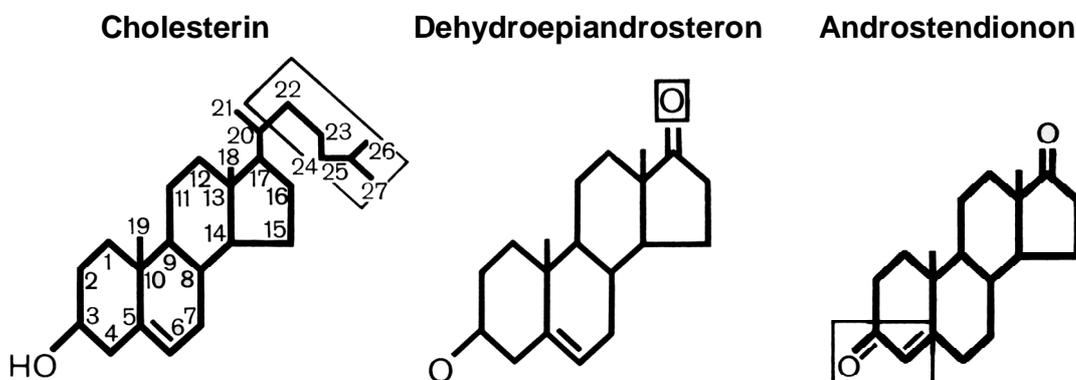


Abbildung 2: Strukturformeln des Cholesterin-Grundgerüsts und der NNR-Androgene Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion, als Beispiele für je ein Δ^5 -Steroid, bzw. Δ^4 -Steroid. Die markierten Gruppen sind Ziele der Hydroxylasen und Reduktasen der Androgen-Biosynthese

1.2 Bedeutung der NNR-Androgene

Androgene sind definiert als Substanzen, die eine Virilisierung des Genitale bewirken. Sie werden unter hypothalamisch-hypophysärer Kontrolle gebildet: durch LH-Stimulation in den Gonaden, und unter Einfluss des ACTH in den NNR. Die Biosynthese aller Steroidhormone unterliegt komplexen Kaskaden von Enzymschritten [251]. Die Gene dieser Enzyme wurden im letzten Jahrzehnt kloniert und lokalisiert [230, 308], ebenso wie die Struktur zahlreicher weiterer Proteine und Coenzyme identifiziert wurde, die den Ablauf der einzelnen Enzymreaktionen in zonen- bzw. zellspezifischer Weise regulieren (vgl. Kapitel 1.3).

Das quantitativ bedeutsamste NNR-Androgen ist das lipophile DHEA (Abbildung 2), und seine hydrophile Speicherform DHEA-Sulfat. DHEA wird auch als „Mutter-Hormon“ bezeichnet, weil es eine Schlüsselposition in der Sexualsteroid-Synthese innehat, und die meisten Wirkungen indirekt über seine periphere Konversion zu Testosteron oder Östrogenen erklärbar sind (Reviews in [8, 175]). Als Zwischenstufe entsteht Androstendion, welches ebenfalls als NNR-Androgen betrachtet wird, obwohl es physiologisch wahrscheinlich überwiegend extraadrenal gebildet wird (s. Abschnitt 1.3.3). Bekanntlich wirken NNR-Androgene schwächer als Testosteron; ihnen ist vor und in der Pubertät eine Bedeutung für Wachstum und Sexualbehaarung beigemessen worden. Aber, obwohl die erste Beschreibung von DHEA durch A. Butenandt bereits 1934 erfolgte, wurde seine Bedeutung erst in den der letzten Dekade genauer erfasst. Grundsätzlich kann DHEA als Marker physiologischer Reifungsvorgänge gelten [91]: z.B. ist es intrauterin mit dem fetalen Wohlergehen assoziiert.

Die Wirkweise im Kindesalter wird durch Behandlungsversuche mit DHEA und seiner offenbar von Geschlecht und Alter geprägte Konversion zu aktiven Sexualsteroiden widerspiegelt. Bei Kindern mit konstitutioneller Entwicklungsverzögerung konnte die Erhöhung der DHEA/S-Spiegel durch DHEA-Enanthat-Injektionen keinen Wachstumschub erzielen [299], und die 2-jährige Behandlung von Kindern mit NNR- oder Hypophysen-Insuffizienz mit DHEAS in physiologischer Dosis (10 mg/d) zeigte keine Wirkung, abgesehen von einer transienten Brustdrüsenanschwellung bei 2 Mädchen [91]. Ein Einfluss von NNR-Androgenen auf die Aufnahme der gonadalen Funktion, die "Reifung des Gonadostaten", konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden [89].

Wie Sklar [300] darlegte, verlaufen gonadale Entwicklung und Adrenarche grundsätzlich unabhängig voneinander. Sind allerdings die NNR-Androgene anhaltend und massiv erhöht, wie beim unbehandelten AGS oder NNR-Tumor, so können sie zur vorzeitigen zentral ausgelösten Gonadenaktivierung führen [331]. In vitro wirken Androgene stimulierend auf die Wachstumsfuge. In vivo gilt jedoch nur als gesichert, dass massiv erhöhte NNR-Androgene, wie beim schlecht behandelten AGS, zur Beschleunigung von Wachstum und Knochenreifung führen (Review in [62]). Bei Mädchen soll hier insbesondere die Erhöhung der Androstendion-Spiegel und ihre Aromatisierung zu Östrogenen eine Rolle spielen [62].

Erst in den letzten Jahren beginnt sich anhand kontrollierter, randomisierter Studien abzuzeichnen, wie DHEA tatsächlich wirkt (Review [9]). Doch schon lange vor den nachweisbaren Effekten wurden DHEA und DHEAS als Jungbrunnen bezeichnet [26]. Zum einen beruht dies auf ihrer Rolle als Schutzfaktor vor Mamma-Ca und vor Mortalität an kardiovaskulären Erkrankungen [251], wie sie aus epidemiologischen Untersuchungen hervorgeht. Zum anderen wirkt DHEA im ZNS als "Neurosteroid" (s.u. und Review in [95]). Eine Verbesserung der Stimmung, der Libido, des Wohlbefindens und der Ausdauer durch DHEA ist jedoch nur bei NNR-Insuffizienz oder psychischer Erkrankung eindeutig erwiesen. Bislang liegt nur bei Frauen mit NNR-Insuffizienz eine gesicherte Indikation für die DHEA-Therapie vor [9, 242].

Die Besonderheit der NNR-Androgene liegt in folgenden Befunden:

1. Sie werden – bei jungen Erwachsenen - in grosser Menge gebildet (Abb. 2, 3) [90, 251]. Direkt aus der NNR stammen dabei 60 bis 90 % der täglichen Produktion von DHEA (ca. 10 mg) und mindestens 40 % der Produktion von DHEAS (ca. 15 mg/Tag) sowie von Androstendion (ca. 2,5 mg/Tag); der überwiegende Anteil von DHEAS und Androstendion wird beim Erwachsenen in Peripherie und Gonaden gebildet.
2. Die eigene Wirkung von DHEA, DHEAS und Androstendion am Androgenrezeptor ist nicht von Bedeutung (Review in [8]). Sie werden nämlich in den Zielgeweben u.a. zu Testosteron und Dihydrotestosteron konvertiert und damit aktiviert, oder anderweitig umgewandelt [186] (s. Abschnitt 1.3.3.).
3. Dieses Prinzip der extragonadalen Sexualsteroidbildung ist nur beim höheren Primaten möglich [186].
4. Im Fettgewebe reichern sich bedeutende Mengen von DHEA und Androstendion an [64].
5. Die Konzentration von DHEA und DHEAS im Gehirn ist höher als im Serum. DHEA/S kann dort synthetisiert und direkt als sogenanntes „Neurosteroid“ wirksamen werden [26, 95].

Daraus geht hervor, dass die Beurteilung der NNR-Androgen-Regulation und Wirkung auf einfache Weise, anhand von Serumspiegeln, nur näherungsweise möglich ist.

1.3 NNR-Androgen-Synthese und Metabolisierung

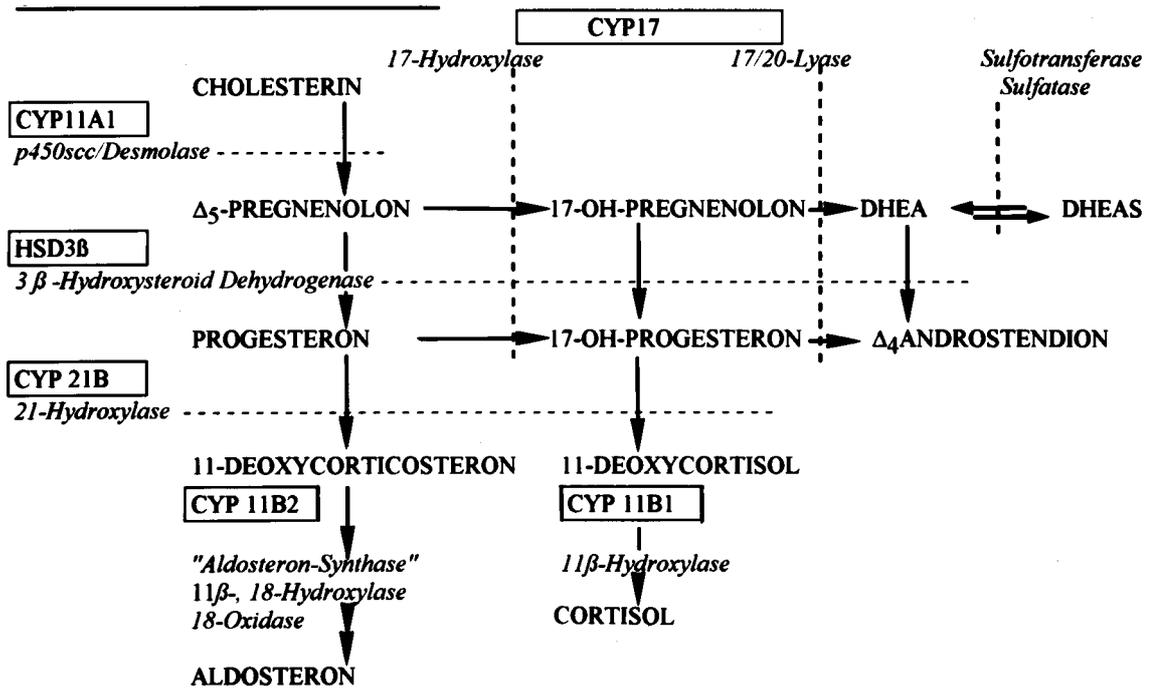
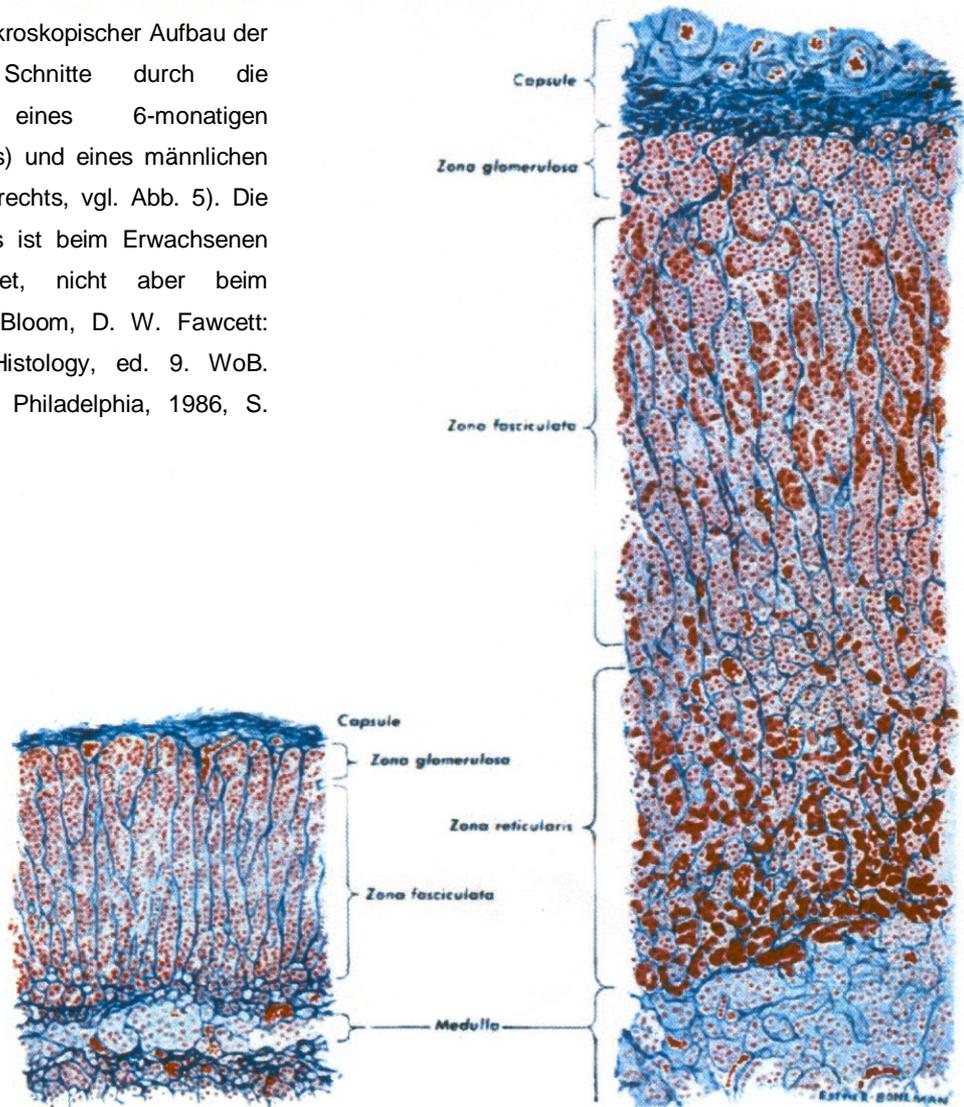


Abbildung 3: Steroidsyntheschema der NNR. Umrahmt sind die Gene, welche die verschiedenen Enzyme kodieren. CYP = Gen eines Cytochrom p450-Enzyms

1.3.1 Zonen- und Organ spezifische Androgen-Synthese beim Menschen:

Die physiologische Steroidsekretion ist offenbar vom intakten Aufbau der NNR-Zonen abhängig (Abb.4). Zum einen ist jeder Zonen-spezifische Zelltyp individuell mit Enzymen und Coenzymen ausgestattet, so dass er nur ein charakteristisches Steroidmuster herstellen kann. Nach Endoh & Hornsby [84] sind altersabhängige physiologische Veränderungen der NNR-Androgensekretion nicht durch Änderung der differenzierten Funktion einer „Ursprungszelle“, sondern durch eine Zu- bzw. Abnahme der Reticularis-Zellzahl zu erklären. Zum anderen ist offensichtlich der intakte architektonische Aufbau Voraussetzung für dieses spezifische Muster der Steroidproduktion [66, 124]. Bedingt durch den zentripetalen Blutfluss der NNR bildet sich ein Steroid-Konzentrations-Gradient; marknah ist Cortisol in der Zona Reticularis hochkonzentriert. Cortisol bewirkt wohl als Pseudosubstrat eine Abnahme der 11 β - und 21-Hydroxylase-Aktivität [52, 67, 127]. Daher kann Cortisol in dieser Zone kaum gebildet werden [127], obwohl die CYP11B1- und CYP21-Proteine dort nachweisbar sind [54]. Allein dieser Aufbau der NNR erlaubt die bevorzugte Androgensynthese in der Zona reticularis, so dass gemäß Anderson die Existenz eines übergeordneten „Cortical Androgen Stimulating Hormone“ (CASH) nicht postuliert werden muss [5].

Abbildung 4: Mikroskopischer Aufbau der Nebenniere. Schnitte durch die Nebenniere eines 6-monatigen Säuglings (links) und eines männlichen Erwachsenen (rechts, vgl. Abb. 5). Die Zona reticularis ist beim Erwachsenen gut ausgebildet, nicht aber beim Säugling. [W. Bloom, D. W. Fawcett: Textbook of Histology, ed. 9. WoB. Saunders Co., Philadelphia, 1986, S. 461].



Androgene werden in der Zona reticularis des Menschen vorwiegend aus Pregnenolon und 17-Hydroxypregnenolon, also über den delta-5-en-Weg, hergestellt (Abb. 3). In dieser frühen Phase der Steroidsynthese ist der Transport von Cholesterin über den wässrigen Raum in der Mitochondrien-Membran an die innere Seite durch das ACTH-stimulierbare Protein „STAR“ (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt [308]. Wichtigster und geschwindigkeitsbestimmender Schritt zur Synthese des DHEA ist die bifunktionale Aktivität des CYP17-Proteins [50]: Zunächst wird 17-Hydroxy-Pregnenolon gebildet mittels der 17-Hydroxylase-Aktivität des p450c17-Enzyms, und dann das C19-Steroid DHEA, mittels der 17,20-Lyase-Aktivität des durch das gleiche Gen codierten Enzyms. DHEA kann in der NNR zu DHEAS sulfatiert werden [291], oder, in geringem Mass, zu delta4-Androstendion mittels 3 β -HSD umgewandelt werden. Der sogenannte delta-4-Weg, die Konversion von 17-Hydroxy-Progesteron zu Androstendion, wird in der Zona reticularis seltener beschrieben: das menschliche P450c17-Enzym wandelt delta-5-Vorstufen wie 17-Hydroxy-Pregnenolon (17-OH-Preg.) effizienter in Androgene um als das delta 4-Homolog 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP). Dies hängt mit der Lokalisation des Coenzyms Cytochrom b5 in der Zona reticularis zusammen, wie untenstehend ausgeführt [156, 219]. In den Reticulariszellen kann Androstendion physiologisch nur minimal gebildet werden [128], weil sie relativ wenig 3 β -HSD [50, 84, 219, 312] exprimieren. Zudem wird Androstendion in der NNR bevorzugt zum 11-Hydroxyandrostendion hydroxyliert [203]. Es müssen mit dem zentripetalen Blutfluss sehr grosse Mengen an delta-4 Vorstufen angeboten werden, damit nennenswerte Mengen Androstendion sezerniert werden können.

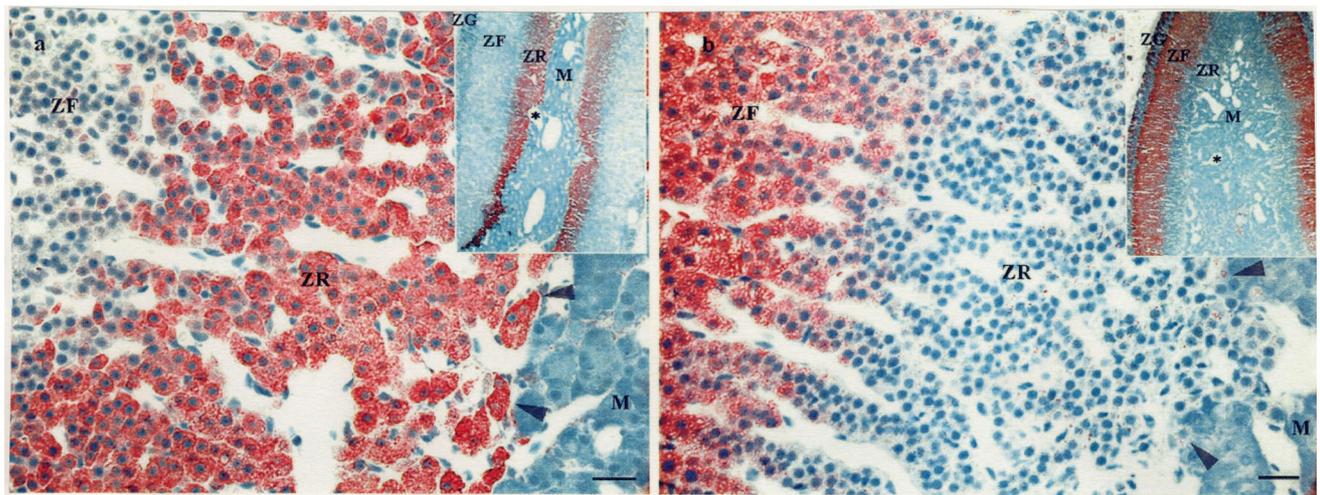


Abbildung 5: Immunzytochemische Lokalisierung a) des Cytochrom b5 und b) der 3 β -HSD in der NNR des erwachsenen Rhesusaffen. Die Zona Glomerulosa (ZG), Fasciculata (ZF) und Reticularis (ZR) sowie die Medulla (M) und Medullarvenen (*) sind in den eingefügten Verkleinerungen angegeben. Corticomedulläre Grenze mittels Pfeil bezeichnet. Eine Expression ist als rote zyttoplasmatische Färbung sichtbar. Die 3 β -HSD-Färbung ist in der Reticularis nur sehr gering zu finden (Pfeilspitzen, in b). [219].

Dies ist ja beim 21-Hydroxylase-Mangel der Fall durch das Überangebot an 17-Hydroxyprogesteron (vgl. Abbildung 3). In pathologischen Situationen, wie bei hirsuten Frauen, wurde die Sekretion von Androstendion nach ACTH-Stimulus in der NN-Vene gemessen [130], so dass es bei Hyperandrogenämie sicher in der NNR gebildet werden kann. In der Zona Fasciculata, im Ovar und im Hoden wird DHEA normalerweise nicht sezerniert. Dort wandelt die Typ II-3 β -HSD Pregnenolon und DHEA weiter um in aktive Hormone wie Cortisol, Progesteron und Östrogene oder Testosteron [8, 222].

1.3.2 Enzymaktivität und Regulation durch Coenzymkonzentration

Die Synthese der Androgene wird Organ-spezifisch gesteuert. Dies wird durch die lokale Bildung von spezifischen Coenzymen erzielt, die die bifunktionale Aktivität des p450c17-Enzyms regulieren [50]. Dementsprechend wird Cytochrom b5 ausschliesslich in der Zona reticularis der NNR höherer Primaten exprimiert (s. Abb 5, 6) [219, 312], während in den Hoden besonders viel NADPH-p450-Reduktase zu finden ist [50]. Cytochrom b5 ist ein Elektronendonorsystem, welches die Aktivität der 17/20-Lyase proportional zur Bereitstellung seiner Reduktionsäquivalente steigert (Abb. 3, 6) [156]. Dadurch kann vermehrt DHEA gebildet werden, obwohl dasselbe Enzym in Abwesenheit eines Elektronendonors als 17-Hydroxylase wirken könnte. In den Hoden bewirkt die NADPH-p450-Reduktase [30, 100], dass eine überwiegende Androgenbildung erfolgt.

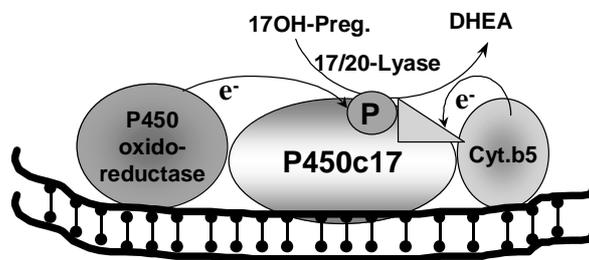


Abbildung 6: Verstärkung der 17/20 Lyase-Aktivität durch die Redoxpartner Cytochrom b5 und NADPH p450-Oxidoreduktase. Auch die posttranslationelle Phosphorylierung (P) steigert auf ungeklärte Weise die 17/20 Lyase-Aktivität [30, 100, 176].

1.3.3 Metabolisierung in NNR und Peripherie

Die Sulfatierung des DHEA zu DHEAS (Abb. 3) erfolgt extraadrenal oder auch sogleich in der Zona reticularis [312]. Sie verhindert die weitergehende Aktivierung durch die 3 β -HSD sowie die metabolische Clearance und vergrößert so den Androgen-Vorrat. Dagegen führen andere enzymatische Umwandlungen zur Steigerung der Androgen-Wirkung: In den letzten Jahren wurde bewiesen, dass die sexualsteroid-aktivierenden Enzyme (Sulfatase, 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase/5-en-4en-Isomerase, 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase und 5 α -Reduktase, Abb. 7) in zahlreichen Geweben exprimiert werden, z.B. in Fettgewebe, Muskulatur und lymphatischen Organen [221]. Sie entwickeln dort DHEA/S zu Androstendion, Testosteron oder Dihydrotestosteron weiter (Literatur in [185]). DHEA kann zu Östrogenen aromatisiert und in den einzelnen Geweben spezifisch reguliert [252] werden, oder wird letztlich peripher inaktiviert (Sulfotransferase, 5 β -Reduktase, 3 α -HSD [90]); wie jedoch die Gen-Expression und Aktivität der Enzyme in der Zielzelle reguliert werden, ist nicht genau bekannt [283].

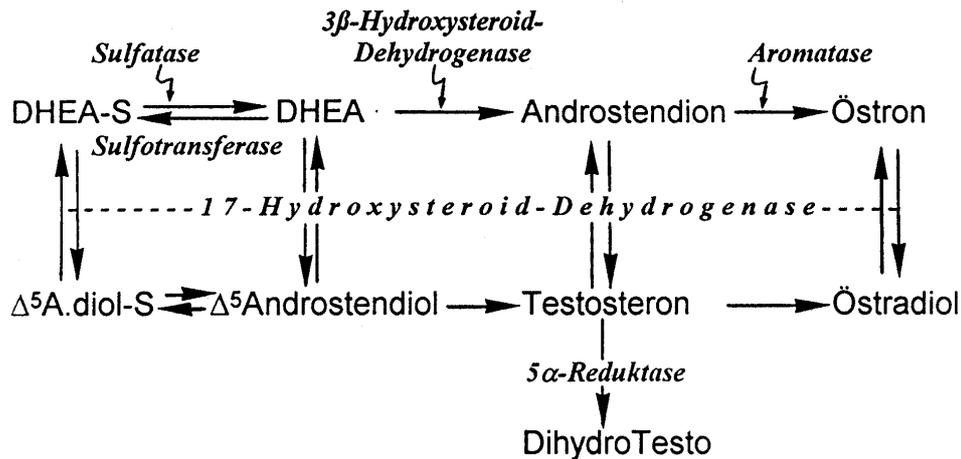


Abbildung 7: Periphere Metabolisierung. S = Sulfat.

Damit unterliegen Regulation und Wirkung der adrenalen Androgene eigenen, lokalen Prinzipien. Die Erkenntnis, dass die Wirksamkeit der NNR-Androgene durch ihre periphere Metabolisierung bedingt, und nicht an Blutspiegeln ablesbar ist, begründete den Begriff der „Intrakrinologie“. Im Gegensatz zur „Endokrinologie“ beschreibt jener, dass Hormone aus ihren Vorstufen innerhalb derselben Zelle hergestellt und wirksam werden [184].

1.4 Regulation der NNR-Androgenbildung – bisheriger Kenntnisstand

1.4.1 Regulationsprinzip

Die Glucocorticoid-Sekretion wird rasch, mit angemessen hoher Kapazität, und eindeutig stringent reguliert, um der vitalen Bedeutung der adäquaten Reaktion auf Stress gerecht zu werden. Dagegen dient die Sekretion der NNR-Androgene eher der Vorratshaltung für Sexualsteroiden und, durch die neuroendokrine Wirkung des DHEA, der Verbesserung der Lebensqualität. Die NNR-Androgen-Regulation ist dementsprechend sehr komplex organisiert. Folgende Prinzipien lassen sich bisher erkennen und dienen als Grundlage für die durchgeführten in vitro- und in vivo-Untersuchungen:

1. Die Zell-spezifische Enzym- und Coenzym-Ausstattung begrenzt die Synthese auf bestimmte Steroide in den verschiedenen Zonen (s. Kapitel 1.3.).
2. Ein übergeordnetes Hormon, z.B. ACTH oder ein anderes Proopiomelanocortin (POMC)-Spaltprodukt, reguliert die NNR-Androgen-Sekretion (s. Abschnitt 1.4.2.).
3. Die qualitative Antwort der NNR-Zellen auf eine gleichbleibende ACTH-Sekretion ändert sich im Laufe des Lebens [278] und könnte durch NNR-intrinsische Mechanismen, wie lokale Wachstumsfaktoren, bewirkt werden [259] (s. Abschnitte 1.4.3. und 1.4.4.).
4. Die Morphogenese der Zona reticularis an sich ist Voraussetzung für die Androgen-Synthese [128, 248], wie oben erwähnt (1.3.1.), und auch diese wird durch lokale Faktoren (s. Abschnitt 1.4.4.) ermöglicht.

Vorwiegend die in 3. genannten Mechanismen sollen *in vitro* geprüft werden, insbesondere die Wirkungen der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren auf die Sekretion von NNR-Androgenen. Die unterschiedlichen Wirkprinzipien seien zunächst jedoch erläutert.

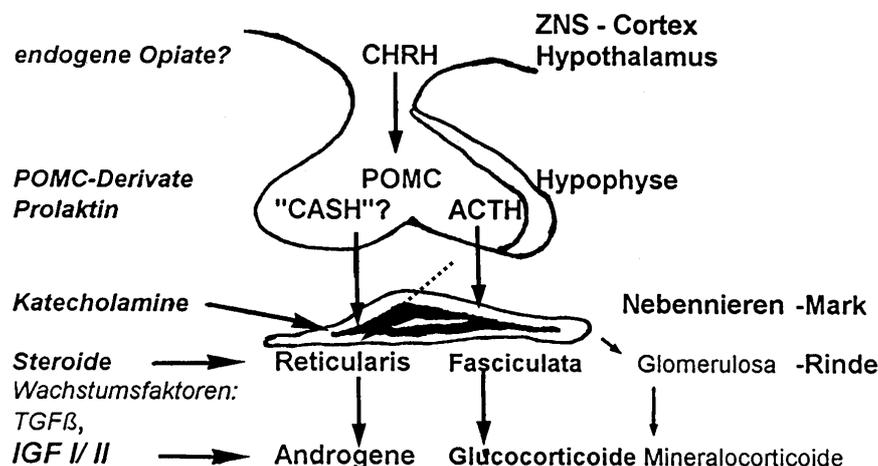


Abbildung 8: Schematische Darstellung der NNR-Androgen-Regulation. CHRH = Corticotrophes Hormon-Releasing-Hormon; POMC = Proopiomelanocortin; CASH = Cortical Androgen Stimulating Hormone; TGF β =Transforming Growth Factor beta; IGF-I/II = Insulin Like Growth -Factor I oder II.

1.4.2 Regulation durch hypophysär-hypothalamische Hormone

Verschiedene hypothalamische und hypophysäre Hormone wurden auf ihre NNR-Androgen-stimulierende Wirkung hin untersucht (Abb. 8).

Unter experimentellen Bedingungen konnte für das Corticotrophin-Releasing-Hormon (CRH) eine direkte Wirkung auf die die DHEA/S-Bildung in fetalen NNR-Zellen gesichert werden [42, 249, 303], *in vivo* hat CRH wohl eher permissiven Charakter, wie die unten näher beschriebene ACTH-Wirkung [107, 133, 134].

Prolaktin wird nur in supraphysiologischen Konzentrationen zum NNR-Androgen-stimulierenden Hormon. [111, 122], Review in [175, 176]. Es gibt keine Hinweise auf eine DHEAS-Regulation durch Prolaktin in physiologischen Situationen [114, 164].

Für die physiologische Regulation der NNR-Androgen-Sekretion sind im Wesentlichen ACTH und vielleicht auch POMC-Spaltprodukte von Bedeutung.

1.4.2.1 ACTH

Neben anderen Faktoren ist ACTH ein notwendiger, aber nicht hinreichender Stimulator der NNR-Androgenbildung (s. Abb. 8). Zum einen zeigen Kinder mit ACTH-Resistenz eine verzögert Adrenarche und erniedrigte DHEAS-Spiegel [325], und eine 6-wöchige ACTH-Therapie von Kleinkindern steigert neben den Cortisol-Serum-Spiegeln auch die von Androstendion und DHEAS [320]. Zum anderen weisen zahlreiche klinische Beobachtungen und Experimente auf eine Glukokortikoid-unabhängige Regulation der Androgene beispielsweise im Stress hin [175]; dabei beruht die relative DHEA-Abnahme darauf, dass ACTH die 3 β -HSD- und 17-Hydroxylase-Aktivität bzw. Expression stimuliert, und damit die Bildung von Cortisol mehr als DHEA steigert [334]. Des Weiteren haben hypophysektomierte und gonadektomierte Schimpansen, die adäquat mit

ACTH und anderen Hormonen ausser DHEA substituiert wurden, haben eine normale Cortisol-, aber verringerte DHEA-Sekretion [3].

1.4.2.2 CASH und andere POMC-Derivate

Neben ACTH wurden verschiedene Proopiomelanocortin (POMC)-Spaltprodukte, z.B. α -MSH [19] als Stimulatoren der NNR-Androgensynthese dargestellt, meist mit widersprüchlichen Ergebnissen. Erst kürzlich erhielten die alten Arbeiten zur adrenalen Wirkung von POMC-Spaltprodukten dadurch eine neue Beachtung, dass eine adrenale Serin-Phosphatase isoliert wurde, die in der Nebenniere pro-y-MSH spaltet [32], in y-MSH und N-POMC, welche die Steroidogenese bzw. Mitose der NNR stimulieren. Dagegen erwies sich ein von Parker [250] als CASH beschriebenes Peptid aus dem N-Terminalen Bereich des POMC in anderen Arbeitsgruppen an humanen adulten und fetalen NNR-Zellen als wirkungslos [260].

Für β -Endorphin, ein C-terminales POMC-Spaltprodukt und opiodes Hormon, wurde eine Steigerung der ACTH-stimulierten NNR-Androgensynthese in humanen NNR-Zellen beschrieben [48]. Zudem zeigt es in der Kindheit und Vorpubertät einen parallelen Anstieg zum DHEA/S [101]. Beta-Endorphin soll auch bei Adipositas erhöht sein, ebenso wie die NNR-Androgen-Spiegel [29, 102]. Dennoch geben experimentelle Untersuchungen alles in allem keine sicheren Hinweise auf eine spezifische und physiologische Regulation der DHEA-Synthese durch Opiate [73, 74]

1.4.3 NNR-Regulation durch nicht-hypophysäre Faktoren

Bekanntlich wird die NNR-Steroid-Synthese durch das Renin-Angiotensin-System reguliert, welches extra- und intraadrenal lokalisiert ist. Es ist wesentlich für die Aldosteron-Sekretion der Zona glomerulosa verantwortlich, kann aber auch die Cortisol-Synthese stimulieren, wie in humanen Fasciculata-Retikularis-Zellen gezeigt wurde [197]; es spielt für die Androgen-Sekretion nur bei Enzymdefekten, z.B. dem 21-Hydroxylasemangel, eine Rolle, wenn sich die Vorstufen anschoppen, z. B. 17-OHP, und daraus Androgene synthetisiert werden [238]. Von grösserer Bedeutung für die NNR-Androgen-Synthese sind die im folgenden erwähnten Hormone bzw. Leptin.

1.4.3.1 Insulin

Insulin nimmt gewiss wesentlich Einfluss auf die adrenale Androgenbildung. Die Befunde an bovinen NNR-Zellen zeigen jedoch, dass die Androgen-Synthese durch verschiedene Insulinkonzentrationen gegensätzlich reguliert wird [167]. Sicher besitzt die menschliche NNR Insulinrezeptoren in äquimolarer Menge wie IGF-Typ1-Rezeptoren [265], aber nicht in der Zona fasciculata; über den genauen Wirkmechanismus des Insulins in humanene NNR-Zellen – über eigene Rezeptoren oder IGF-Rezeptoren (s. Kapitel 1.4.4.1.) – war aber bisher nicht viel bekannt. Beim Menschen erscheinen die verschiedenen Wirkungen des Insulins auf die NNR-Androgene aufgrund ihrer Abhängigkeit von Konzentration, Geschlecht und Alter widersprüchlich, und sollen hier nur als Phänomene aufgezeigt werden:

Klar ist, dass bei Frauen Insulin-Infusionen die Androstendion-Spiegel mehr als die Cortisol-Spiegel erhöhen [310]. Ähnlich findet sich bei Frauen mit Polycystischem-Ovar-Syndrom oder Adipositas, neben verschiedenen Ausprägungen von Hyperinsulinämie und Insulinresistenz, eine Erhöhung von NNR-Androgenen [150, 252], und DHEAS korreliert positiv mit Insulin-Spiegeln (Übersicht in [236]). Es war bisher unklar, ob diese Wirkungen direkt über Insulin, oder über die Erhöhung der IGF-I – Bioaktivität erfolgen ([223] & Review in [132]). Auch bei Kindern mit Adipositas wirken offenbar Insulinresistenz und Hyperinsulinämie [61, 63] mit an der beobachteten NNR-Androgen-Erhöhung oder Prämaturen Adrenarche (s. Kapitel 1.6.) [244].

Dagegen weisen gesunde erwachsene Männer mit [314] oder ohne Übergewicht nach medikamentös induzierter Hyperinsulinämie eine Erniedrigung von DHEA/S auf [236], bedingt durch die erhöhte Metabolisierung dieser

Steroide [194, 237]. Ferner kann DHEA/S auch bei Frauen erniedrigt sein, wenn sie einen Typ-2-Diabetes haben [333], oder extrem übergewichtig sind [60].

1.4.3.2 *Leptin und Adipositas*

NNR-Androgene sind erhöht bei Kindern mit Adipositas [102, 266]); sie wurden für deren präpubertäre Wachstumsbeschleunigung verantwortlich gemacht [61]. Leptin, das in Fettzellen produzierte Peptid, könnte diese beobachteten Veränderungen hervorrufen, da sein Rezeptor in der NNR exprimiert wird. In einer humanen NNR-Tumorzelllinie stimuliert Leptin in physiologischen Konzentrationen spezifisch und dosisabhängig die 17/20-Lyase-Aktivität des Cytochrom P450c17-Enzyms [31]. In höheren, unphysiologischen, Dosen verringert es die gesamte ACTH-stimulierte NNR-Steroid-Sekretion durch Hemmung auf der Ebene der Transkription und Protein-Synthese der P450c17- und STAR- Enzyme. [45, 112, 269]. Klinische Untersuchungen fehlen, um die Gültigkeit dieser in vitro-Befunde in vivo zu bestätigen.

1.4.3.3 *Einfluss anderer Steroide auf die Enzymaktivität*

Von den zirkulierenden Steroidhormonen nimmt nicht nur Cortisol selbst Einfluss auf die Enzymaktivitäten der Zona reticularis [52, 67, 127], wie oben beschrieben (1.3.1.). Unter Behandlung mit Testosteron nehmen die Breite und Androgen-Sekretion der Zona reticularis zu bei männlichen und weiblichen Hamstern, während sie unter Östradiol-Therapie bei männlichen Hamstern abnehmen [217, 339]. Bei Frauen konnten verschiedene Untersuchungen belegen, dass Testosteron, vor allem in sehr hohen Dosen, die gesamte ACTH- stimulierte adrenale Steroidsekretion steigert [17, 86, 267].

ACTH und weitere POMC-Spaltprodukte, gonadale Steroidhormone sowie Leptin bilden extraadrenale Steuerelemente, die in ihrer Bedeutung für die adrenale Steroidsynthese des Menschen und hinsichtlich Alters- und Konzentrations-Abhängigkeit noch nicht vollständig analysiert sind [240, 276] (Abb.8).

1.4.4 *Intraadrenale Regulation*

1.4.4.1 *Neuroendokrine und parakrine Regulation adrenocorticaler Zellen*

In den letzten Jahren mehrten sich Befunde, die das klassische Konzept der endokrinen Regulation der hormonbildenden Organe allein durch übergeordnete Hormone in Frage stellten. So wurden auch für die NNR Regulationsmechanismen aufgedeckt, die in der Nebenniere selbst lokalisiert sind.

Die vollständige Kontrolle der NNR-Funktion schliesst die Regulation der Blutzufuhr, die Innervation und die parakrine zelluläre Interaktion ein. Zudem sind Mark und Rinde der NN morphologisch und funktionell vernetzt: Bornstein [35] und Mitarbeiter konnten zeigen, dass sowohl chromaffine Zellen die Rinde durchsetzen, als auch Rinden-Inseln das Mark. In den chromaffinen Zellen werden nicht nur Katecholamine, sondern auch andere Neurotransmitter wie Serotonin und eine Fülle von Neuropeptiden gebildet oder gespeichert und sezerniert, wie das zuvor erwähnten CRH und Cytokine, Wachstumsfaktoren und vasoaktive Substanzen. Diese intraadrenal gebildeten Faktoren können differenziert auf die Steroid-Sekretion wirken. Die Befunde wurden kürzlich in mehreren Arbeiten zusammengefasst [35, 36, 74, 176]. Aber ob diesen lokalen Substanzen eine physiologische parakrine Bedeutung für die NNR-Androgensynthese zukommt, ist ungewiss.

1.4.4.2 *IGF-I und -II*

Klinische Beobachtungen wiesen schon seit langem auf eine Bedeutung von Wachstumshormon (= Growth hormone, GH) oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs) für die steroidbildenden Organe hin. Es wurde von mehreren Autoren hervorgehoben, dass zum Beispielsind bei „echtem isoliertem Wachstumshormon-Mangel“ die DHEAS-Spiegel erniedrigt sind [49] und oft erst unter GH-Therapie ein DHEAS-Anstieg [284], bzw.

die adrenale und gonadale Reifung erfolgen [313]. Zum anderen ergab sich aus Beobachtungen an Mädchen mit Anorexia nervosa [329] ein Zusammenhang zwischen Körpergewicht, IGFs und NNR-Androgenbildung. Dennoch war in älteren Untersuchungen an Kindern und Jugendlichen kein Zusammenhang zwischen IGF-I- und DHEAS-Spiegeln festzustellen, ebensowenig wie für Insulin [302]. Eine Erklärung für diesen fehlenden Nachweis könnte darin liegen, dass sich die biologische Aktivität der IGFs in der Zielzelle aufgrund der Modulation durch Bindungsproteine nur schwer erfassen lässt [27, 87]. Zudem ähnelt die Wirkung der IGFs naturgemäß der des Insulins, da sowohl diese Peptide, als auch die Insulin- und Typ-1-IGF- Rezeptoren wesentliche Struktur-Homologien aufweisen, und Kreuzreaktionen stattfinden. Da Insulin in hohen Konzentrationen seinerseits die hepatische IGF-I - Bildung stimuliert, und die Bioverfügbarkeit des IGF-I über die Senkung des IGFBP1 erhöht, sind die Wechselwirkungen in vivo komplex [196, 204].

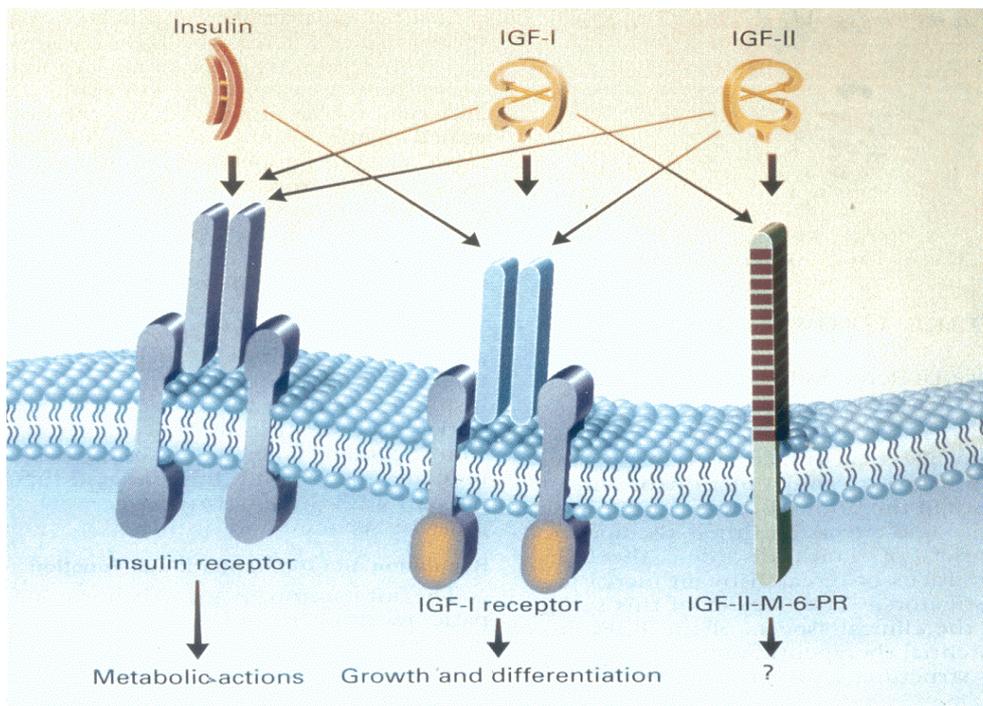


Abbildung 9: Schema der IGF- und Insulin- Kreuzreaktion an den Rezeptoren [196]

Neben den gut dokumentierten wachstumsfördernden Eigenschaften der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF's) wird zunehmend ihre Bedeutung für die zelluläre Differenzierung erkannt. In vitro wurde gezeigt, dass sie in steroidbildenden Organen eine endokrine, parakrine und autokrine Rolle für den Erhalt differenzierter Zellfunktionen spielen, z.B. in den Gonaden [2, 20, 288], oder in der bovinen NNR (s.u.). In einem Regelkreis verstärken oder modulieren sich wechselseitig organspezifische Stimulatoren, wie FSH, hCG, ACTH, Steroidhormone, wie Östradiol, Testosteron, Cortisol, und Wachstumsfaktoren, wie IGF-I und -II. IGF-I stimuliert an bovinen NNR-Zellen die ACTH-Rezeptorzahl [256], die Aktivität der Second-Messenger-Systeme [189] und die Aktivität bzw. mRNA-Expression der Steroenzyme 3β -HSD, CYP21 sowie CYP11B [255]. Zugleich bilden ACTH-inkubierte bovine NNR-Zellen selbst IGF-I und IGF-Bindungsproteine [257], und die Zahl der adrenalen IGF-Rezeptoren wird durch ACTH und Angiotensin II gesteigert [212].

Erste Ergebnisse an adulten humanen NNR-Zellen sprachen dafür, dass IGF-I nicht nur die 3β -HSD, 11- und 21-Hydroxylase stimuliert (Review in [259]), sondern auch die 17-Hydroxylase, und damit die Bildung reifer Steroide insgesamt [264]. Zudem besitzt auch die humane NNR IGF-I - Rezeptoren, vorwiegend in der Zona reticularis [265].

Die fetale NNR enthält immunhistologisch IGF-I - und -II- Peptid und ihre Bindungsproteine [123], während dies von adulten NNR noch nicht bekannt war. Die mRNA-Expression von IGF- I [225] und IGF-II [108, 147, 211], konnte bislang nur in intaktem Gewebe adulter NNR gezeigt werden, nicht aber ihre Regulation in NNR-Zellkulturen [108, 147, 211]. In fetalen NNR-Zellen dagegen wird die IGF-II mRNA erheblich exprimiert [118] [145] und durch ACTH reguliert [225], parallel zu dem Enzym P450scc [146, 318]; IGF-II steigert die fetale Steroidbiosynthese [318], und insbesondere die DHEAS-Produktion [226, 227]. Über die Expression von IGF-I mRNA in fetalen NNR gibt es positive und negative Befunde [118, 317]. Während die IGF-I – Bedeutung postnatal bekannt und wichtig ist, und IGF-II als fetaler Wachstumsfaktor gilt, fehlen detaillierte Kenntnisse über physiologische Funktionen von IGF-II jenseits der Fetalperiode (Review in [290]).

1.4.5 *TGF β 1*

Andere Wachstumsfaktoren, wie das in NNR-Zellen exprimierte TGF β 1, leisten einen Beitrag zur differenzierten NNR-Funktion, indem sie eine im wesentlichen dem IGF entgegengerichtete Wirkung hervorrufen [198]. TGF β ist in menschlichen Fasciculata-Reticularis-Zellen ein potenter Inhibitor aller differenzierten Funktionen. Es hemmt die mRNA-Expression der 17-Hydroxylase und stimuliert die Expression der 3 β -HSD, woraus eine gedrosselte DHEA-Bildung folgt [198]. Es ist damit der einzige Wachstumsfaktor, der diese Enzyme gegensinnig reguliert und selbst durch ACTH gehemmt wird. Um einen relativen DHEA-Anstieg gegenüber Cortisol zu erzielen, wie während der Adrenarche (s. Kapitel 1.5.), muss eine Abnahme eine Abnahme der 3 β -HSD und damit der TGF β -Expression postuliert werden.

1.4.6 *Zusammenfassung des bisherigen Kenntnisstandes zur Regulation der NNR-Androgene*

Kurz zusammengefasst lässt sich die Steuerung der NNR-Androgene postulieren aus einem Zusammenwirken von zellulärer Enzym- und Coenzym-Ausstattung und lokalen Wachstumsfaktoren, sowie durch die mit der besonderen Vaskularisierung anströmenden Steroide, unter permissiver Kontrolle von ACTH und weiteren POMC-Derivaten. Zirkulierende Hormone, z.B. Insulin, und Zytokine, z.B. Leptin, die die Körperzusammensetzung signalisieren, können wahrscheinlich die NNR-Androgen-Bildung modulieren. Diese Hypothesen sind in vivo noch nicht umfassend geprüft.

1.5 *Adrenarche*

Die allmähliche morphologische und funktionelle Reifung der Zona reticularis, die vor bzw. unabhängig von der Reifung der Gonaden erfolgt [246, 300], wird als Adrenarche bezeichnet, und leitet die menschliche Pubertätsentwicklung ein. In einem sehr langsamen, seit früher Kindheit zu beobachtenden Prozess [246] treten ab dem 7. Lebensjahr infolge der vermehrten DHEA- und DHEAS-Sekretion sowie der peripheren Metabolisierung zu aktiven Androgenen die Sebum-Sekretion, die sekundäre Geschlechtsbehaarung und der Schweissdrüsen Geruch auf. Es ist aber noch nicht wissenschaftlich belegt [275], ob auch unter physiologischen Bedingungen die während der Adrenarche sezernierten Androgene so stark auf Skelettreifung und Wachstumsgeschwindigkeit wirken, dass sie den präpubertären Wachstumsschub (mid-growth spurt) erzeugen, der im Alter von 7 Jahren beobachtet werden kann [97, 231].

Die Veränderungen der androgenbildenden Nebennieren-Zonen, nämlich neben der Adrenarche auch die Involution der fetalen NNR, stellen beim Menschen einzigartige Vorgänge dar, deren Regulationsmechanismen nur in Ausschnitten bekannt sind. Vorbedingung für die Adrenarche ist eine normale ACTH-Sekretion [325] (s.

Kapitel 1.4.2.2.). Zudem nahm man früher an, dass auch während der Adrenarche die Änderung von Enzymaktivitäten Grundlage für die Androgenbildung sei [278, 292], und dass diese durch die besondere Architektur der NNR moduliert werden könnten [5]. Die physiologisch ablaufende Adrenarche ist jedoch nicht auf die Regulation bzw. Blockierung der Aktivitätsänderung eines vorhandenen Enzyms zurückzuführen, sondern auf die Expression spezifischer Gene in einem Zelltyp, bzw. die Differenzierung dieses Zelltyps [84, 219, 312]. Auch Unterschiede in der molekularen Struktur der Enzyme bei verschiedenen Primaten scheinen nicht für die Adrenarche verantwortlich zu sein [10]. In Einklang mit den morphologischen Änderungen ist die Adrenarche gekennzeichnet durch die Abnahme der 3 β -HSD-Expression in den Reticularis-Zellen; diese weisen vor dem Alter von 5 - 8 Jahren eine hohe 3 β -HSD-Expression auf, und, nach der Differenzierung, mit zunehmendem Alter eine niedrige [58, 98, 99]. Im gleichen Alter nimmt in der Zona reticularis der immunhistochemisch nachweisbare Gehalt der DHEA-Sulfotransferase und des Cytochrom b5, welches die 17,20-Lyase-Funktion begünstigt, zu [312] (Abb. 5). Als Resultat steigt vor allem die adrenale DHEAS-Bildung an.

Der Antrieb für die Differenzierung der Zona reticularis entsteht nach neueren Untersuchungen am ehesten aus dem Wachstum zuzuordnenden Vorgängen. Es mehren sich die Hinweise, dass primär Wachstum und Körperzusammensetzung sich ändern, und in Korrelation dazu die Adrenarche folgt [274]. In Analogie dazu gilt bezüglich der weibliche Pubertätsentwicklung seit langer Zeit, dass das Erreichen einer kritischen Körpermasse Vorbedingung ist für das Eintreten der Menarche (Somatostat-Theorie) [96]. Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Entwicklung der gonadalen Aktivität vom vorangehenden Ansteigen der Botenstoffe IGF-I [311] und Leptin [218, 311] abhängt. Bisher ist jedoch nicht erwiesen, ob die Somatostat-Hypothese auch für die Adrenarche zutrifft.

1.6 Prämatüre Adrenarche

1.6.1 Definition

Die isolierte Schambehaarung, mit oder ohne Axillarbehaarung und Körpergeruch, vor dem vollendeten 8. Lebensjahr bei Mädchen und dem vollendeten 9. Lebensjahr bei Jungen, Prämatüre Pubarche genannt, wird als Prämatüre Adrenarche (PA) bezeichnet, wenn sie bedingt ist durch die vorzeitige Sekretion der NNR-Androgene. Da die Androgene zunächst ausschliesslich aus der NNR stammen [165, 224], sind bei Mädchen die Brustdrüsen nicht vergrössert und bei Jungen das Hodenvolumen kleiner als 3 ml. Nur die zeitliche Steuerung der Androgen-Sekretion ist vorverlegt [261]. Die Höhe der NNR-Androgenspiegel übersteigt normalerweise die dem Behaarungsstadium entsprechenden Werte nicht [166]. Im amerikanischen Sprachraum wird weiter differenziert: bei der typischen PA sind neben der geringen Androgenisierung nur eine mässige Wachstumsbeschleunigung und Skeletalter-Akkzeleration zu beobachten, die dem Längenalter entsprechen [287]. Klinische Zeichen für eine atypische PA sind die Virilisierung, wie die Vergrösserung des Genitale, oder eine übermässige Skeletalterakkzeleration (> 2 Jahre), die dann auf eine pathologische Ursache hinweisen, wie untenstehend besprochen. Grundsätzlich erfolgt nach der typischen PA die weitere gonadale Pubertätsentwicklung altersentsprechend [106, 144], manchmal etwas verfrüht [261]. Die PA tritt bei Mädchen 5 - 6 mal häufiger auf als bei Jungen (Reviews in [21] und [241]), und findet sich oft bei Adipositas [280] oder ZNS-Erkrankungen (Review in [132]). Von einer verstärkten oder „Exaggerated“ Adrenarche spricht man, wenn DHEAS massiv, über das Pubertätsstadium hinaus, erhöht ist, ebenso wie andere ACTH-stimulierte 5-en-Steroid-Vorläufer, z.B. 17-Hydroxy-Pregnenolon, aber auch Cortisol [213]. Man geht hier von einer Insuffizienz der 3 β -HSD-Aktivität und einer übermässigen Stimulation der 17/20 Lyase aus [205]. Bei erwachsenen Frauen wird diese Konstellation auch als funktionelle adrenale Hyperandrogenämie, FAH, bezeichnet [282].

1.6.2 Vorkommen

Da das Alter bei physiologischem Beginn der Pubarche ethnisch unterschiedlich ist, erscheint die Inzidenz der Prämaturren Adrenarche in manchen Bevölkerungsgruppen erhöht. Die Diagnosestellung der PA sollte demnach die ethnische Herkunft berücksichtigen, Populations-abhängige Referenzdaten existieren jedoch nicht. In einer US-amerikanischen Studie an 17077 Mädchen, beispielsweise, fand sich im Alter von 6 Jahren eine Schambehaarung bei 6,5 % der schwarzen Mädchen, und nur bei 1,4 % der caucasischen (Review in [132]). Daher ergibt sich ein hoher Anteil an Kindern mit PA in schwarzen sowie in hispanischen Bevölkerungsgruppen in den USA. In Europa scheint, gemessen an der Zahl der Beobachtungen, die Inzidenz der PA in den Mittelmeerländern [21, 56, 106, 144] höher als in den übrigen europäischen Regionen zu sein [162, 261, 319], obwohl es keine vergleichenden Daten gibt. In Berlin lag zwischen 1980 und 1990 der Anteil der Patienten mit PA oder Hirsutismus bei ca. 0,4 % aller pro Jahr in der endokrinologischen Sprechstunde vorgestellten Patienten, so dass die Prävalenz dieser Störung in der allgemeinen Population im betreffenden Alter noch weit niedriger sein muss. In einer vorangehenden Studie hatten wir an 33 Kindern mit idiopathischer PA, verglichen mit 50 Kindern ohne endokrine Erkrankungen, gefunden, dass ungefähr 55 % der Kinder mit PA deutscher Abstammung waren, im Vergleich zu 83 % in der Kontrollgruppe. Der Anteil der türkischen, slawischen oder mediterranen Kinder in der Gruppe der PA war relativ grösser als in der Kontrollgruppe [173]. Daher könnten Ursachen, Häufigkeit und Prognose der PA in der Berliner gemischten mitteleuropäischen Population anders als in den von anderen Autoren untersuchten Populationen sein.

1.6.3 Ursachen und Diagnostik

Tabelle 1: Ursachen erhöhter NNR-Androgene im Kindesalter (verändert nach [104])

Primär adrenale Genese	
	Prämaturre Adrenarche
	Adrenale Tumoren (Adenome, Carcinome)
	Cushing-Syndrom
ACTH-Übersekretion	
	Adrenogenitales Syndrom
	Cushing-Krankheit
	Glucocorticoid-Resistenz (Cortisol ↑, ACTH ↑, normaler circadianer Rhythmus)
Exogen	
	Androgene
	Anabole Steroide

Eine Diagnostik bei PA dient dem Ausschluss primärer Störungen (Tabelle 1), und vor allem bei atypischer PA der Suche nach NNR- Tumoren und Enzymdefekten, die einer entsprechenden operativen Therapie bzw. Substitution mit Hydrocortison bedürfen. Ein schwerer, bzw. klassischer NNR-Enzymdefekt würde sich bei Mädchen schon bei Geburt erkennen lassen, und nicht als PA, während er sich bei Jungen gegebenenfalls auch noch später im Kindesalter durch eine vorzeitige Schambehaarung manifestiert. Vorwiegend zwei Enzymdefekte können sich als PA ohne perinatale Virilisierung und Intersexualität präsentieren und zum nicht-

klassischen bzw. spätmanifesten Adrenogenitalem Syndrom (AGS) führen, der 21-Hydroxylasemangel (21-OH-Mangel) und der 3 β -HSD-Mangel. Dagegen wurde der 11 β -Hydroxylasemangel nur ein mal als Ursache der isolierten PA beschrieben [295] und ist hier nicht weiter berücksichtigt. Die Diagnosestellung des 21-OH-Mangels erfolgt durch die Bestimmung der erhöhten Vorstufe 17-OHP; es gibt seit mehr als 10 Jahren recht einheitliche Grenzwerte und Nomogramme aus verschiedenen Studien: Hinweisend für ein nicht-klassisches AGS sind die ACTH-stimulierten Werte des 17-OHP über 10 ng/ml [192, 239], meist sind auch schon die basalen Werte deutlich erhöht über 1,5 ng/ml, aber es gibt ohne Stimulation Überschneidungen mit heterozygoten Merkmalsträgern, Gesunden und Frauen mit PCOS (s. Methoden, Kapitel 5).

Die Diagnosestellung des 3 β -HSD-Mangels [233, 247, 262, 316] war vor der Anwendung der Molekulardiagnostik umstritten [16], und nach strengen Kriterien definiert als 17-OH-Preg. >6 SD über dem mittleren Normwert. Letztlich wiesen Patienten mit sogenanntem nicht-klassischem 3 β -HSD-Mangel (17-OH-Preg. >2 SD über der Norm [214]) keine Defekte in den codierenden Regionen des 3 β -HSD-Gens auf. Tatsächlich haben Patienten mit später Manifestation bei molekulargenetisch gesichertem 3 β -HSD-Mangel exzessiv erhöhte 17-OH-Preg Werte, die mehr als 30 SD (!) über der Norm liegen [214]. Bei den früher fehldiagnostizierten Patienten scheint daher eher eine „Exaggerated“ Adrenarche vorzuliegen.

Als weitere Besonderheit wurden bereits früher biochemische Hinweise präsentiert, dass heterozygote Überträger des 21-Hydroxylase-Mangels gehäuft unter einer PA leiden könnten [162]. Bereits 1978 wurden von Zachmann ungewöhnlich ausgeprägte klinische und/oder biochemische Befunde bei obligat heterozygoten Eltern von Kindern mit AGS beobachtet [335]. In einer anderen Studie mit für den 21-Hydroxylase-Defekt heterozygoten Frauen konnte aber keine erhöhte Prävalenz der hyperandrogenämischen Störungen gefunden werden [160]. Nun haben aber kürzlich molekulargenetische Untersuchungen in amerikanischen und mediterranen Populationen [56, 330] bestätigt, dass eine erhöhte Frequenz der heterozygoten 21-OH-Gendefekte bei PA vorliegt, im Vergleich zu Kontroll-Populationen. Es wurde noch nicht bestätigt, dass diese Befunde auch in der mitteleuropäischen Bevölkerung zu erheben sind, da ja die Frequenz des 21-Hydroxylase-Gendefektes unterschiedlich in verschiedenen Populationen ist.

1.6.4 Prognose

Für das Kind mit Prämaturer Adrenarche ist die Prognose dieser Störung wichtig, und davon wiederum hängt der Aufwand ab, mit dem initial eine invasive oder apparative Diagnostik betrieben werden muss. In zwei mediterranen Populationen wurde gezeigt, dass die Endgrösse und das Menarchealter durch die PA nicht beeinträchtigt sind [106, 144]. Allerdings kann bei bis zu 45% dieser Mädchen mit PA später ein Polyzystisches Ovar-Syndrom entstehen [138]. Das PCOS ist definiert als Hyperandrogenämie mit Anovulation, begleitet von Hirsutismus und Zyklusstörungen sowie metabolischen Auffälligkeiten unterschiedlicher Ausprägung [65]. Leider fehlen in mitteleuropäischen Populationen grössere Studien, die klinische Zeichen und Differentialdiagnosen sowie die zugehörigen Prognosen und Therapieindikationen untersuchen. Gleichermassen gibt es selbst dazu keine Untersuchungen, ob und wann bei Patienten mit milden Enzymdefekten, bei manifesten Heterozygoten oder Patienten mit „Exaggerated“ Adrenarche eine Therapie indiziert ist. Verwendet wurden bisher in Einzelfällen u.a. Dexamethason [319]), Hydrocortison [262] oder Cyproteron-Acetat [120], ohne dass die Effekte auf Endgrösse und Fertilität dokumentiert sind. Bei typischer PA scheint jedoch aufgrund der günstigen Prognose eine Therapie nicht notwendig [287].

Uneinigkeit besteht also in folgenden Punkten: 1. Wie gross soll der diagnostische Aufwand bei typischer PA sein?, 2. in wie weit kann eine Heterozygotie für einen Enzymdefekt der 21-Hydroxylase Symptome der PA

verursachen, und 3. handelt es sich bei der „Exaggerated“ Adrenarche (s. Kapitel 1.6.1.) um eine klinisch abgrenzbare Entität?

1.6.5 *Adipositas und Einfluss auf die Adrenarche*

Wie oben erwähnt, kann die Adipositas bei Kindern von einer prämaturen Adrenarche begleitet sein [102, 266]. Ob dabei IGF-I [216, 324], Leptin [31, 105], Insulin [139, 168, 244] oder weitere mit der Adipositas zusammenhängende Faktoren Auslöser der Hyperandrogenämie sind, ist unbekannt. Über die epidemiologische Bedeutung dieses funktionellen Zusammenhanges und die Höhe sowie das Muster der NNR-Androgenspiegel bei übergewichtigen Kindern gibt es keine Untersuchungen. Dessen ungeachtet wird die Prämatüre Adrenarche häufiger auftreten, aufgrund der Zunahme der Adipositas-Prävalenz im letzten Jahrzehnt auch in Deutschland [154, 158, 169, 190]. Während 1995-97 bei 5 - 7-jährigen Vorschulkindern die Prävalenz des Übergewichtes (Body Mass Index (BMI, in kg/m^2) > 90. Perzentile) zwischen 12 und 18,5 % betrug [154, 190], lag sie für ältere Schulkinder deutlich höher, zwischen 20 und 27 % [158, 169].

Interessanterweise wurde auch bei Kindern mit der hypothalamisch-hypophysären Insuffizienz bei Prader-Willi-Syndrom (PWS) eine vorzeitige Adrenarche beobachtet (Übersicht in [172]). Das Prader-Willi-Syndrom ist eine neurogenetische Erkrankung, die die häufigste Form der syndromalen Adipositas darstellt. Der adipöse Phänotyp entwickelt sich nach einer anfänglichen Gedeihstörung bei ausgeprägter Muskelhypotonie und mentaler Retardierung erst ab dem 4. Lebensjahr und ist mit verschiedenen hypothalamischen Störungen verbunden, Wachstumshormoninsuffizienz [77] und Hypogonadismus [117] wurden dokumentiert. Unerwartet fand man trotz der grundsätzlich verzögerten gonadalen Entwicklung recht häufig eine frühe inkomplette Pubertätsentwicklung in Form einer vorzeitigen Schambehaarung [37, 172]. Bisher wurde nicht geprüft, ob die vorzeitige Pubarche Folge der hypothalamischen Störung ist, oder sekundär durch die Adipositas selbst oder die mit ihr zusammenhängenden metabolischen oder endokrinen Veränderungen bedingt ist. Während bei Kindern mit einfacher Adipositas die Spiegel von IGF-I und Insulin erhöht sind, finden sich bei Kindern mit PWS aufgrund des hypothalamischen Wachstumshormonmangels eher niedrige IGF-I und Insulin-Konzentrationen [80, 207].

1.7 Fragestellung

Die überschüssige Androgenproduktion stellt ein häufiges endokrinologisches Problem erwachsener Frauen dar, und soll ihren Ursprung bereits in der peripubertären Reifung haben. Die Pathogenese der Hyperandrogenämie konnten weder bei Kindern, noch bei Erwachsenen ganz geklärt werden. Um Aufschluss über die physiologischen und pathologischen Grundlagen der Androgen-Sekretion der Nebennierenrinden zu erhalten, wurden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zu folgenden Fragestellungen durchgeführt:

1. Mit der vorliegenden *in-vitro*-Untersuchung sollten erstmals NNR-Zellen in Primärkultur von Kindern und Erwachsenen untersucht werden, mit der Frage, welche Wirkung die Wachstumsfaktoren IGF-I und -II auf die Steroidsynthese haben, im Vergleich zu ihnen nahestehenden Hormonen wie Wachstumshormon und Insulin. Vor Beginn der vorliegenden Untersuchungen waren die meisten Arbeiten zur NNR-Androgen-Regulation an nicht-humanen *in-vitro*-Modellen durchgeführt worden. Oft wurden auch NNR-Tumor-Zelllinien verwendet, die jedoch in ihrer Gen-Regulation und Enzymausstattung nicht physiologisch sind. Gleichfalls können fetale NNR-Zellen nicht verwendet werden, da die Regulation der Reticularis-Sekretion Altersspezifisch ist. Um zu erfassen, ob Wachstumsfaktoren nicht nur endokrin, sondern auch autokrin wirken, sollte geprüft werden, ob die NNR-Zellen IGF-mRNAs exprimieren, sowie IGF-Peptide und ihre Bindungsproteine sezernieren. Grundsätzlich ist zu zeigen, ob auch in humanen NNR-Zellen ein lokaler positiver Regelmechanismus besteht, in dem unter einer stimulierenden ACTH-Wirkung durch die Modulation aus dem hypothetischen adrenalen IGF-System mehr Androgene als Glukokortikoide gebildet werden.
2. Ein weiteres Ziel war es, zu untersuchen, ob auch *in vivo* bei Kindern und Jugendlichen die *in vitro* beschriebenen verschiedenen Einflüsse auf die NNR-Androgen-Sekretion zu beobachten sind. Dazu wurde anhand von klinischen Querschnittsstudien geprüft, ob Zusammenhänge zwischen der Körpermasse und verschiedenen mit ihr verbundenen Hormonen wie IGF-I und Leptin, einerseits, und den NNR-Androgenen, andererseits, bestehen. Als Probanden wurden sowohl gesunde Kindern gewählt, als auch solche, bei denen eine Erhöhung von Leptin-Spiegeln oder IGF-Wirksamkeit zu erwarten ist, wie z.B. adipöse Kinder. Als besondere Gruppe wurden Kinder mit hypothalamischem Defekt bei Prader-Willi Syndrom einbezogen. Da auch bei dieser Form der syndromalen Adipositas eine Androgen-Erhöhung beschrieben wurde, war es ein weiteres Ziel zu untersuchen, ob und wie weit diese Hyperandrogenämie mit Adipositas-induzierten metabolischen und endokrinen Veränderungen im Zusammenhang steht.
3. Die Ursachen einer *verfrühten Adrenarche* sollen erstmalig in einer gemischten mitteleuropäischen Population erfasst, sowie die Einflussfaktoren und die Prognosen kritisch betrachtet werden. Wie häufig wird die PA durch Enzymdefekte oder Tumoren ausgelöst? Lassen sich die Diagnosen einer symptomatischen PA durch besondere klinische Merkmale erkennen? Finden sich in der Gruppe der sogenannten „idiopathischen PA“ noch weitere Untergruppen, wie die „Exaggerated Adrenarche“, und wie lassen sie sich klinisch und biochemisch beschreiben? In einer longitudinalen Untersuchung an Kindern mit PA sollte auch geprüft werden, ob Wachstum und Pubertäts-Entwicklung normal verlaufen, insbesondere ob in den verschiedenen Subgruppen Unterschiede des Wachstums und der Endgröße sowie der Entwicklung eines postmenarchalen Hyperandrogenismus zu finden sind. Auch bei Kindern mit idiopathischer PA galt es zu prüfen, ob die erhöhte Androgen-Sekretion mit einer Adipositas bzw. der Körpermasse, oder deren Mediator, Leptin, zusammenhängt.

2 In vitro-Untersuchungen: Einfluss von Wachstumsfaktoren und Hormonen auf die Steroidsekretion von humanen NNR-Zellen in Primärkultur (Publikationen I [180] und II [179])

2.1 Methoden

2.1.1 Primärzellkultur unter chemisch definierten Bedingungen

Der menschlichen Nebennieren stammten von Transplantations-Spendern, Kindern und Erwachsenen. Die Einwilligung des Ethik-Komitees der Virchow-Klinikums, Humboldt-Universität, Berlin, wurde erteilt. Da ja die Patienten meist im Rahmen der intensivmedizinischen Behandlung Steroide erhalten hatten, wurde die Primärzellkultur, und nicht die Zell- oder Gewebesuspension, gewählt, um die Zellfunktion unter definierten Bedingungen frei von in vivo-Einflüssen zu untersuchen. Ferner bestünde in Subkulturen oder bei Tumorzelllinien die Gefahr des Verlustes bestimmter Steroid-Enzyme, z.B. der 11 β - oder 21-Hydroxylase, wie dies auch der Fall in Kulturen ohne Antioxidantien ist.

Ferner sollte nicht nur die akute Steroidsekretion, sondern auch die Regulation der mRNA- Expression der Steroidsynthese-Gene zu erfasst werden.

Die zellbiologischen Methoden sind im Detail in den bereits publizierten Arbeiten der Arbeitsgruppe Saez beschrieben [180, 199, 255] und in der Übersicht (Abb. 10) schematisch dargestellt.

Nach Transport des Gewebes in eisgekühlter 0,9% NaCl wurden die NNR mit einigen Modifikationen, wie bei Penhoat 1988 angegeben, makroskopisch präpariert und ihre Zona reticularis und fasciculata in Trypsin und in Kollagenase dispergiert sowie nach Waschen und Filtration in 12-Loch-Schalen ausgesät (0,3 - 1,5 x 10⁶ Zellen/ml in 4 cm²). Adhäsion in HamsF12 und DME-Medium zu gleichen Teilen, 10% fetalem Kalbsserum, mit Antibiotika, Vitamin C 0,1 mmol/L, Transferrin 1,25 nmol/L und Insulin 0,86 μ mol/L, während der ersten 16-48 h. Dann Ersatz des Mediums durch das beschriebene Medium, aber ohne Kalbsserum und Insulin, und Inkubation unter untenstehenden Bedingungen. Pro Bedingung wurde jeder Versuch mit mindestens 4 verschiedenen NNR-Präparationen als Triplikat durchgeführt. Inkubationsdauer 2-4 Tage unter 5% CO₂, 37°C; Mediumwechsel alle 24 h. Im Medium, welches nach Zentrifugation aliquotiert und bei -20°C eingefroren wurde, Bestimmung von Steroiden bzw. IGFs und IGFbPs.

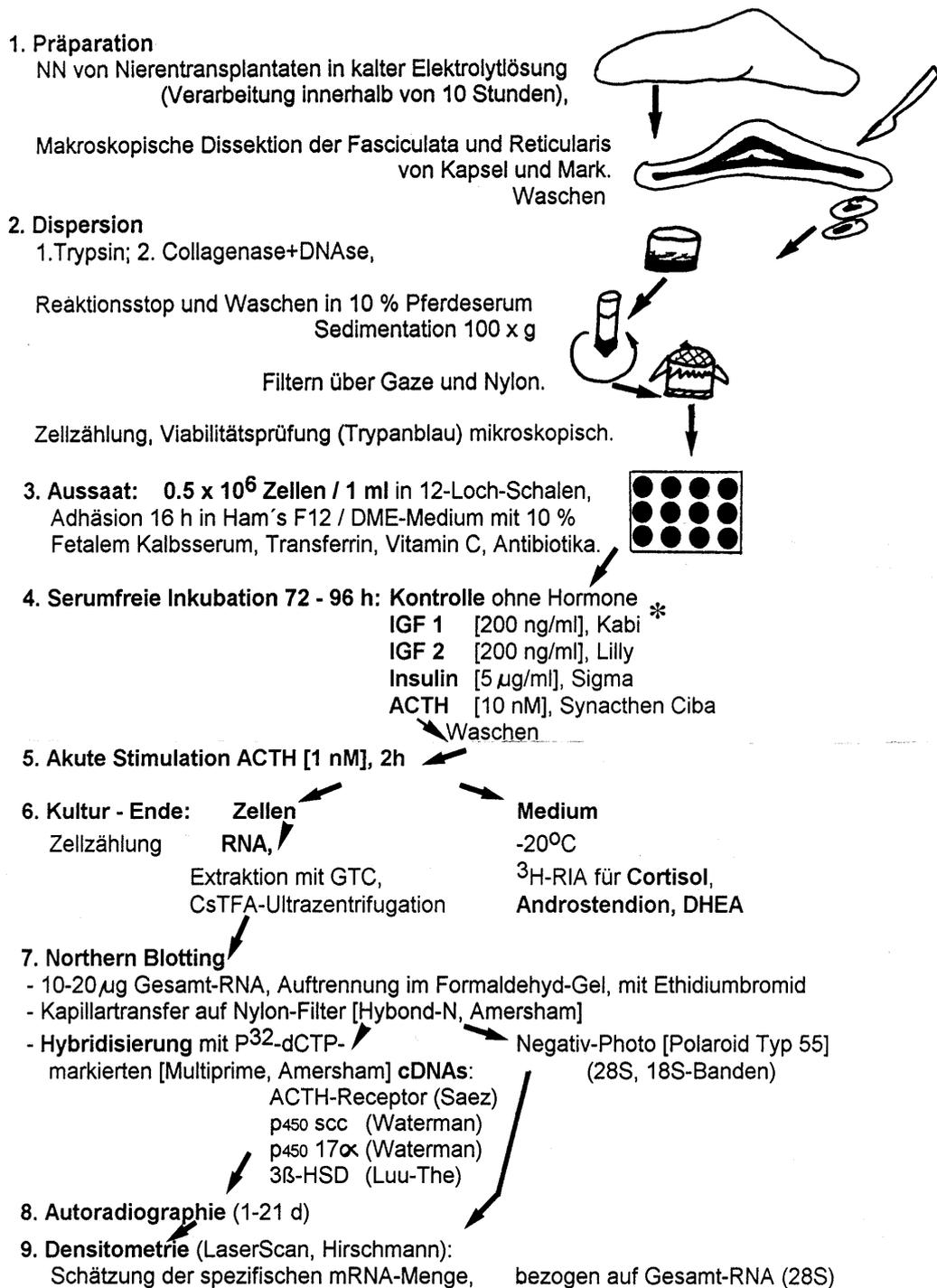


Abbildung 10: Schema der Primärzellkultur, s. Text. * Kabi = Pfizer. GTC = Guanidium-Thiocyanat. CsTFA = Cäsium-Trifluoro-azetat-Gradient. 3H-RIA = Radioimmuno-Assay mit Tritium-markiertem Hormon-Tracer. P32-dCTP = Phosphor-markierte Nucleinäure.

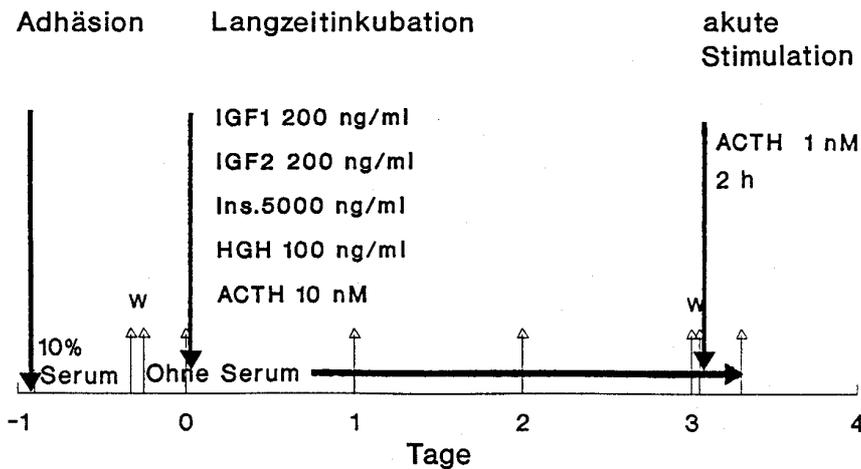


Abbildung 11: Behandlungsschema der humanen Fasciculata-Reticularis-Zellen.

Offener Pfeil = Mediumwechsel, W = Waschvorgang, geschlossener Pfeil = Zugabe der genannten Hormone. im übrigen s. Text.

Abb. 11 zeigt die Hormonbehandlung: Diese wurde erst nach mehrmaligem Waschen der Zellen für mindestens 4 Stunden zum Entfernen der Serum-Bestandteile begonnen. Zur Langzeitbehandlung wurden jeweils einzeln die für die IGF-Bildung in maximal wirksam zu erwartenden Konzentrationen folgender Hormone eingesetzt, deren Dosis-Wirkungs-Beziehungen zuvor an bovinen NNR-Zellen getestet worden waren:

Insulin (I, Sigma) 5 µg/ml = 860 nmol/L, für die Wirkung am IGF-Rezeptor, Synacthen® (ACTH₁₋₂₄, Ciba, Wehr) 10 nmol/L, recombinantes humanes Wachstumshormon (Growth Hormone, GH, Novo Nordisk, Mainz) 100 ng/mL = 4,7 pmol/L, recombinantes humanes IGF-I (IGF-I, Pfizer, Erlangen), meist 50 ng/mL = 6,55 nmol/L oder recombinantes humanes IGF-II (IGF-II, Lilly Bad Homburg), wie IGF-I. Kontrollzellen wurden ohne Hormon inkubiert (C).

Um den Einfluss dieses „Priming“ auf die akute ACTH-stimulierte Steroidsekretion zu erfassen, wurden die gebundenen Peptide durch Inkubation mit Medium ohne Serum- und Hormonzusätze entfernt, meist nach 4 Tagen Vorinkubation. Dann erfolgte die akute Stimulation mit ACTH 1 nmol/L oder mit Steroid-Präkursoren 5×10^{-5} mol/L, über 2 Stunden. Reaktionsstopp auf Eis, Abheben und Asservieren des Mediums wie oben. Die Zellen wurden nach Ablösen durch Trypsin gezählt, oder zur RNA-Extraktion weiterverarbeitet.

2.1.2 Qualitative und quantitative Zellauswertung

In Stichproben konnten über 95 % der Zellen als steroidsynthetisierende Zellen identifiziert werden, die histochemisch für das Enzym 3β-HSD-positiv waren. Wie aus Voruntersuchungen hervorgeht, sind weniger als 10 % Glomerulosa-Zellen enthalten [197]. Die Zellen aus 3 Proben jeder Inkubationsbedingung wurden mit Trypan-Blau lichtmikroskopisch in der Neubauer-Kammer gezählt. Die Viabilität lag immer über 85 %. Da die NNR-Zellen zur Aggregat-Bildung neigen (Abb. 12), wurden sie nach Lösen aus der Kulturschale (durch Trypsin-EDTA) mittels Passage durch eine 20G-Kanüle suspendiert. Trotz serumfreier Hormon-Inkubation zeigte sich unter Behandlung mit IGF-I, II und Insulin ein mässiges Zellwachstum auf 126,2, 103,0 bzw. 129,0 % im Vergleich zu hormonfrei inkubierten Kontrollen, als Ausdruck der mitogenen Wirkung dieser Peptide, nicht aber durch ACTH in vitro (Abb. 12). Die Proteinsynthese nahm unter IGF I, IGF II, Insulin und ACTH gering zu (auf 118, 110, 121 bzw. 113 % der Kontroll-Zellen).

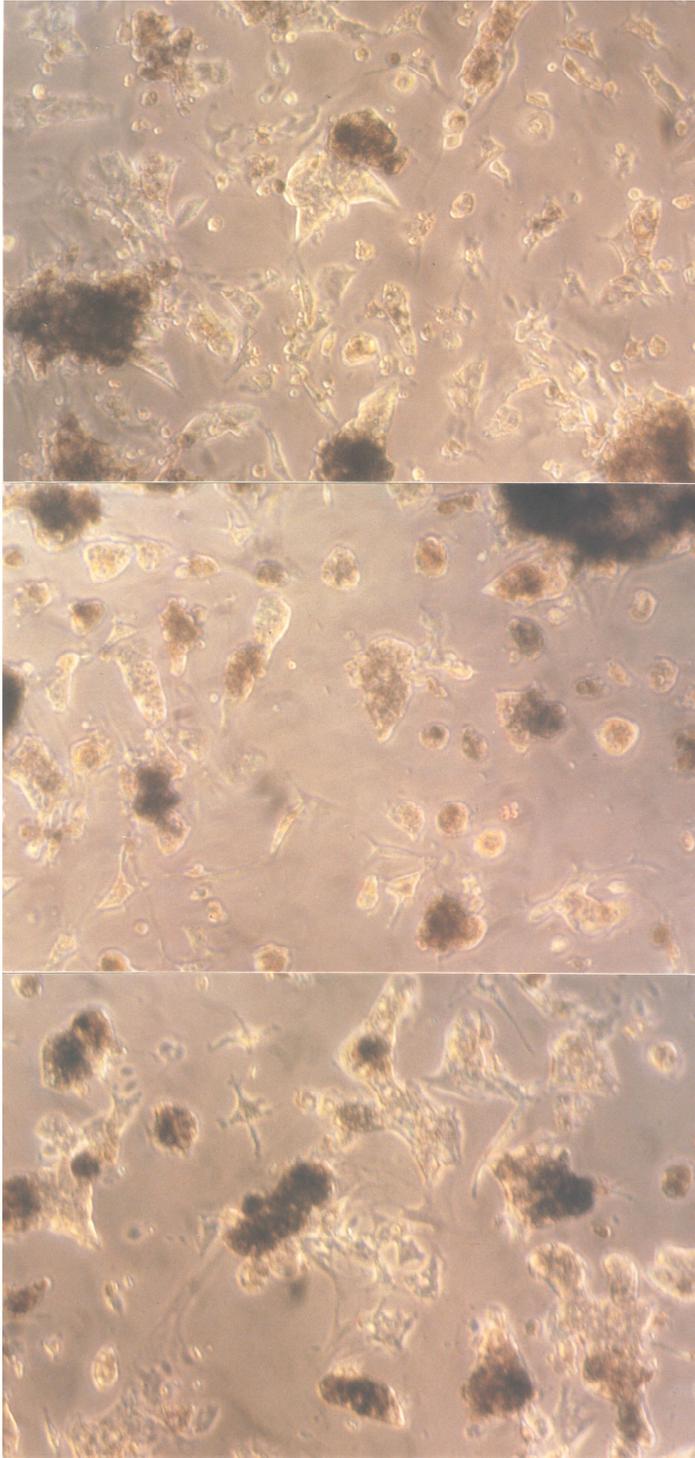


Abbildung 12:

Humane adulte Reticularis-Fasciculata-Zellen am 4. Tag der Kultur,

Oben: Kontrollzellen, granulierte Zellen mit Ausläufern und Aggregaten,

Mitte: 3 Tage mit ACTH 10^{-10} M behandelte, eher kontra-hierte und runden Zellen,

Unten: 3 Tage mit 50 ng IGF-I/ml behandelte Zellen, verstärkte Aggregatbildung.

2.1.3 Steroidhormonbestimmungen

Das Zellkultur-Medium wurde original oder verdünnt direkt in den Routine-³H-Radioimmunoassay für Cortisol, DHEA und Androstendion (Tritium-markierte Steroide von Amersham, Braunschweig) eingesetzt wie zuvor beschrieben [294]. Jede Probe wurde durch zusätzliche 1:2 und 1:4-Verdünnung in verschiedenen Bereichen der Standardkurve abgelesen, so dass eine Verdrängung durch kreuzreagierende Substanzen erkennbar wurde. Bekannte Kreuzreaktionen der Antiseren (Steranti, St. Albans, UK) waren: Anti-DHEA-Kreuzreaktion zu Pregnenolon 3 %, sonst - wie für Anti-Cortisol - < 1 % für alle getesteten Steroide. Anti-Androstendion (Dr. S. Lewicka, Heidelberg) zeigte Kreuzreaktionen lediglich mit Androgen-Metaboliten, nicht aber mit Steroidvorstufen, so dass die Fragestellung hinsichtlich der Stimulation der Androgensynthese mit diesem Assay beantwortet werden konnte. Alle Bedingungen einer Präparation wurden im selben Assay gemessen und die Ergebnisse auf 5×10^5 Zellen bezogen.

2.1.4 IGF- Bestimmungen

IGF-I - RIA nach saurer Äthanol-Extraktion: Da die Bindungsproteine im IGF-RIA interferieren, müssen sie durch saure Äthanol-Fällung (Acetessigsäure 2,175 mol/L in reinem Äthanol) weitgehend entfernt werden [40]. Wie aus Vorarbeiten hervorgeht, ist mit Interferenz durch nicht vollständig entferntes IGF-Bindungsprotein-3 durch dessen geringen Gehalt im Medium nicht zu rechnen. Der lyophilisierte Extrakt von 1 ml Medium wurde in einen Doppel-Antikörper-RIA eingesetzt [44]: Standard mit recombinantem humanem IGF-I (Pharmacia, Erlangen), ¹²⁵J-IGF-I (markiert von Herrn Dr. E. Schmidt, BioTez, Berlin-Buch), polyklonaler IGF-I-spezifischer Antikörper [235], Ziegen anti-Kaninchen-IgG (Pasteur, Leimen).

IGF-II wurde direkt im konditionierten Zellkultur-Medium mit einem spezifischen, IGF-I-gebundenen RIA (Mediagnost, Tübingen) bestimmt.

2.1.5 IGF-Bindungsprotein-Nachweis

Qualitative Analyse der IGF-Bindungsproteine nach Anreicherung aus 2 ml Zellkultur-Medium durch Ultrafiltration (Centricon Filter, Ausschlussgrösse 10000 Da, Millipore, Eschborn) oder durch saure Äthanol-Fällung aus dem Niederschlag. Proteinauftrennung 45-20 kDa in einer Na-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (11 % SDS-PAGE), unter nicht-reduzierenden Bedingungen [257]. Elektrobplot (Biometra Fastplot, Göttingen) der aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Filter (0,45 µm, Schleicher und Schüll, Dassel). Blockierung der unspezifischen Bindungen mit fettarmer Trockenmilch. Identifizierung der Bindungsproteine durch Inkubation mit ¹²⁵J-markiertem IGF-I (Dr. E. Schmidt, BioTez, Berlin-Buch) und Nachweis durch Autoradiographie nach 1-8 Stunden auf Hyperfilm MP (Amersham, Braunschweig). Semiquantitative Auswertung mittels Densitometrie (Hirschmann Laser Densitometer). Bestätigung und Quantifizierung der Ergebnisse durch Bestimmung von IGFBP-1- und -BP-3 im RIA (Mediagnost, Tübingen) im Medium und im Ultrafiltrat.

2.1.6 Gesamt-RNA Extraktion und -Bestimmung

Die Zellen, soweit nicht für die Zellzählung benötigt, wurden in Guanidinium-Thiocyanat geerntet und lysiert, und die Gesamt-RNA mittels kommerziellem Versuchssystem (Pharmacia, Freiburg) nach Ultrazentrifugation im Cäsium-Trifluoroacetat-Gradienten extrahiert. Die RNA-Menge wurde photometrisch bei 260 nm gemessen und die Reinheit im 1,2 % Agarose-Gel mit Ethidium-Bromid geprüft.

2.1.7 *Nachweis spezifischer mRNA im Northern Blot*

10 – 20 µg RNA wurden auf ein 1 % Agarose-Gel mit 10% Formaldehyd geladen und, nach Auftrennung bei 100 V, durch Kapillarwirkung in 20 x SSC auf eine Nylon-Membran transferiert (Hybond-N, Amersham, Braunschweig). Die gleichmässige Beladung mit RNA wurde durch Densitometrie (Hirschmann Laser Densitometer) der Foto-Negative (Kodak Typ 55 Film) von den Ethidium-Bromid gefärbten Membranen geprüft. Unterschiede in der RNA – Beladung konnten um die entsprechenden Werte für die 28s-RNA korrigiert werden. Die Prähybridisierung und Hybridisierung wurden in 50 % Formamid, 5x SSC, mit 5x Denhardts Reagens, 10 % Dextransulfat, 0,5 % SDS und denaturierter Lachssperma-DNA mit bzw. ohne Hefe-RNA durchgeführt, nach üblichen Methoden und wie in [197, 199] angegeben. Folgende Sonden wurden eingesetzt: Humane plazentare 3β-HSD cDNA [215], bovine P45017α cDNA [340], bovine P450scc cDNA [153], ein die gesamte kodierende Sequenz des humanen ACTH-Receptors enthaltendes 955bp-cDNA-Fragment [199], Ea-IGF-I cDNA [151] und IGF-II-variant-cDNA [152]. Alle die cDNA-Sonden enthaltenden Vektoren wurden freundlicherweise von den Autoren zur Verfügung gestellt und im Institut für Humangenetik, Humboldt-Universität, Berlin, G. Gutschmid und Dr. M. Digweed, transformiert und amplifiziert. Die Inserts wurden durch Random Priming markiert mittels Phosphor-markierter Nucleinäure (P³²dCTP, Multiprime Kit, Amersham, Braunschweig).

2.1.8 *Statistische Auswertung*

Alle Ergebnisse sind auf die Zellzahl bezogen und als Mittelwert mit Standardfehler des Mittels angegeben ($\bar{x} \pm \text{SEM}$). Die Steroidsynthese-Ergebnisse sind als Vielfaches der entsprechenden Kontrolle jeder Präparation dargestellt. Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen sind mit dem gepaarten nicht-parametrischen Wilcoxon Rangsummentest berechnet und als signifikant definiert bei einem $p < 0,05$.

2.2 Ergebnisse

2.2.1 Endokrine Regulation der Steroidsynthese (Publikation I [180])

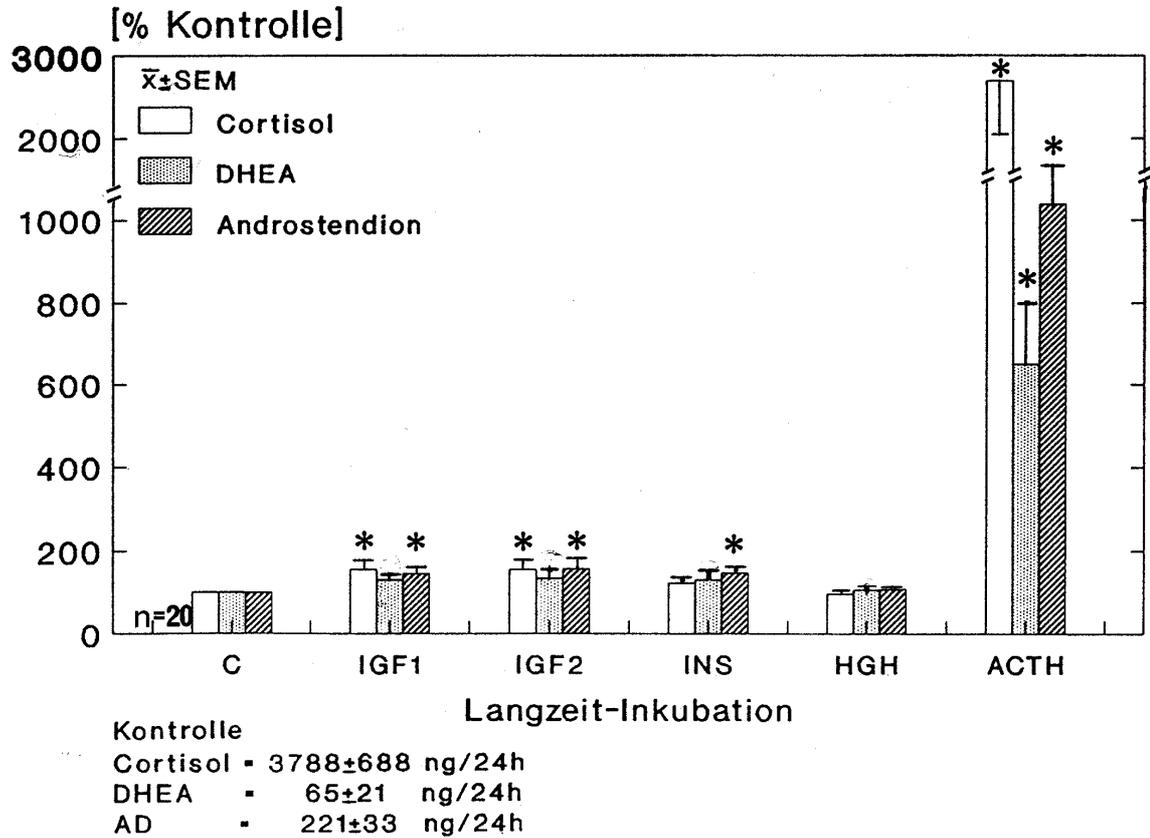


Abbildung 13: Steroidsekretion humaner NNR-Zellen während Langzeit-Behandlung mit verschiedenen Hormonen. Am 2. Kulturtag wurden die Zellen ohne Zusätze (Kontrollen, **C**) oder mit **IGF-I**, **IGF-II** (je 200 ng/ml, 26 nmol/l), Insulin (**INS**, 5 µg/ml, 0,9 µmol/l), Wachstumshormon (**HGH**, 100 ng/ml, 4,7 pmol/l, nur 4 Experimente) oder **ACTH** (24 ng/ml, 10 nmol/l) 3 Tage lang behandelt, pro Bedingung als Triplikat, bei täglichem Mediumwechsel. Die Produktion von DHEA, Androstendion und Cortisol wurde im Medium von 5×10^5 Zellen des letzten Kulturtages bestimmt und als % der Kontrollen angegeben. * $p < 0.05$ versus Kontrollen.

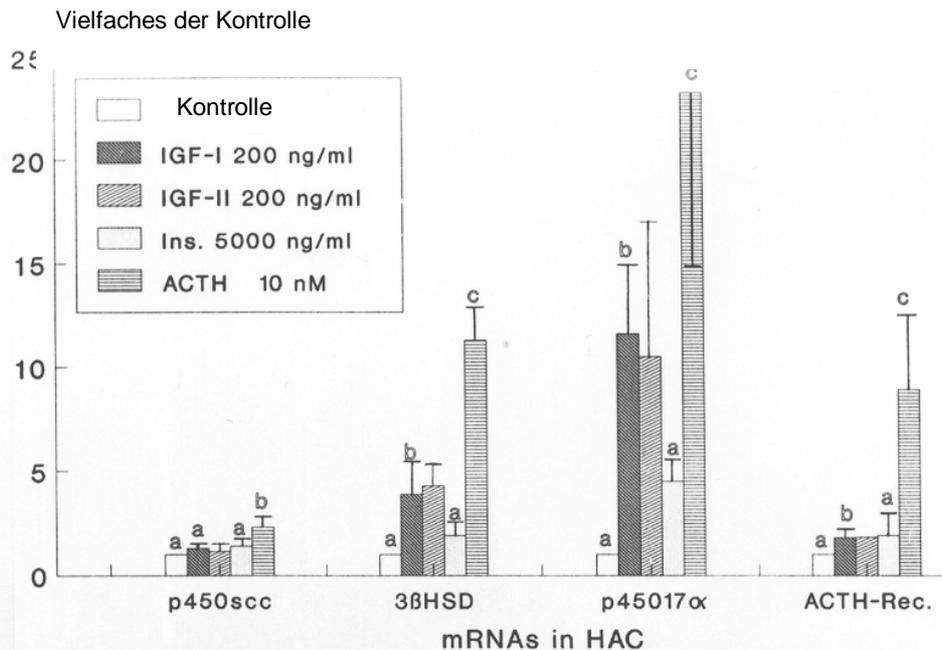
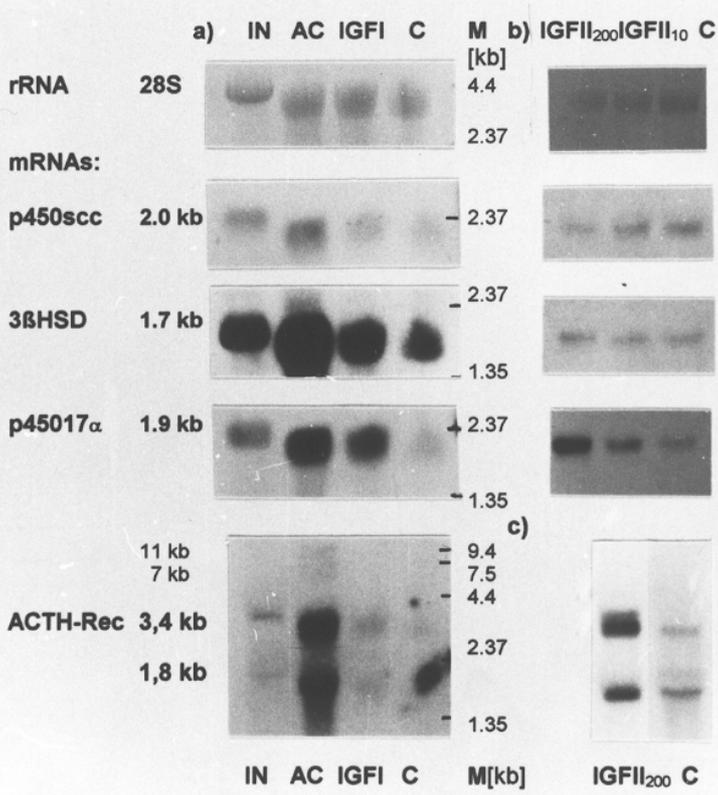


Abbildung 14: mRNA-Expression der Steroenzyme P450scc, 3β-HSD und P450c17α sowie des ACTH-Rezeptors in humanen NNR-Zellen (HAC) durch verschiedene Langzeit-Behandlungen. Vorgehen wie in Abb. 13 angegeben.

Oben: Mittelwerte und SEM des Vielfachen der Dichte-Einheiten der Kontrollen aus Northern Blots von 8 NNR-Präparationen mit **IGF-I** und **ACTH**, 4 mit Insulin (I) und 2 mit **IGF-II**. Die ACTH-Rezeptor-mRNA entspricht der Summe der Haupt-Transkripte (4,4 und 1,8 kb). Signifikante Unterschiede zwischen den Säulen sind durch unterschiedliche Buchstaben angegeben, a ist nicht signifikant verschieden von den Werten der Kontrollen. Unten: Repräsentative Northern Blot - Analysen mit 15 µg Gesamt-RNA (vgl. Ladung mittels Dichte des Photo-Negativs der Ethidium-Bromid gefärbten 28S ribosomalen RNA) von 3 verschiedenen NNR-Zellpräparationen (a, b, c), behandelt vom 2.-6. Kulturtag



mit Insulin 5 µg/ml (0,9 µmol/l), ACTH 10 nmol/l, IGF-I 50 ng/ml (6,6 nmol/l) und IGF-II in 2 Konzentrationen, 200 und 50 ng/ml (26,8 bzw. 6,6 nmol/l), im Vergleich zu Kontrollen (C, Artefakt neben der „C“-Bande des ACTH-Rezeptor-Blots). M, Massen-Marker in kilo-Basen.

2.2.1.1 Kontrollen und ACTH-behandelte Zellen

Wie erwartet produzierten die Reticularis-Fasciculata-Zellen – ohne besondere Hormon-Zusätze – hauptsächlich Cortisol, 10500 pmol / 5x10⁵ Zellen am 4. Tag, das ist das 47-fache der DHEA-Sekretion und das 13-fache der Androstendion-Sekretion (Abb. 13). Dementsprechend zeigte sich in den Northern Blots (Kontrollen, C, in Abb.

14) die deutliche m-RNA-Expression der 3 β -HSD, die den Fasciculata-Zellen entstammen muss, ebenso wie die mRNA-Expression der 17-Hydroxylase und der p450_{scc} mit geringerer Dichte im Northern Blot. Diese Kontroll-Zellen antworteten auch auf die akute ACTH-Stimulation überwiegend mit einer Cortisol-Produktion, im Mittel 2782 pmol / 5x10⁵ Zellen x 2 Stunden, während durchschnittlich nur 132 pmol DHEA und 397 pmol Androstendion / 5x10⁵ Zellen x 2 Stunden gemessen wurden [180]. Die Wirkung des ACTH beruht auf der Steigerung der steroidogenen Kapazität, einerseits durch Erhöhung seiner eigenen Rezeptor -Expression, andererseits durch Stimulation von Steroid-Synthese-Enzymen, vor allem der Stimulation der 17-Hydroxylase-Expression (Abb. 14). Die durchschnittlichen Steroid-Produktionsraten von Erwachsenen werden angegeben mit 10 mg Cortisol, 10 mg DHEA und ca. 2,5 mg Androstendion pro Tag [90]. Das hier benutzte Modell entspricht somit eher der Fasciculata-Funktion. Die weiteren Untersuchungen sollten prüfen, ob durch verschiedene Behandlungen eine der Reticularis-Funktion ähnliche Steroidproduktion zu erzielen ist.

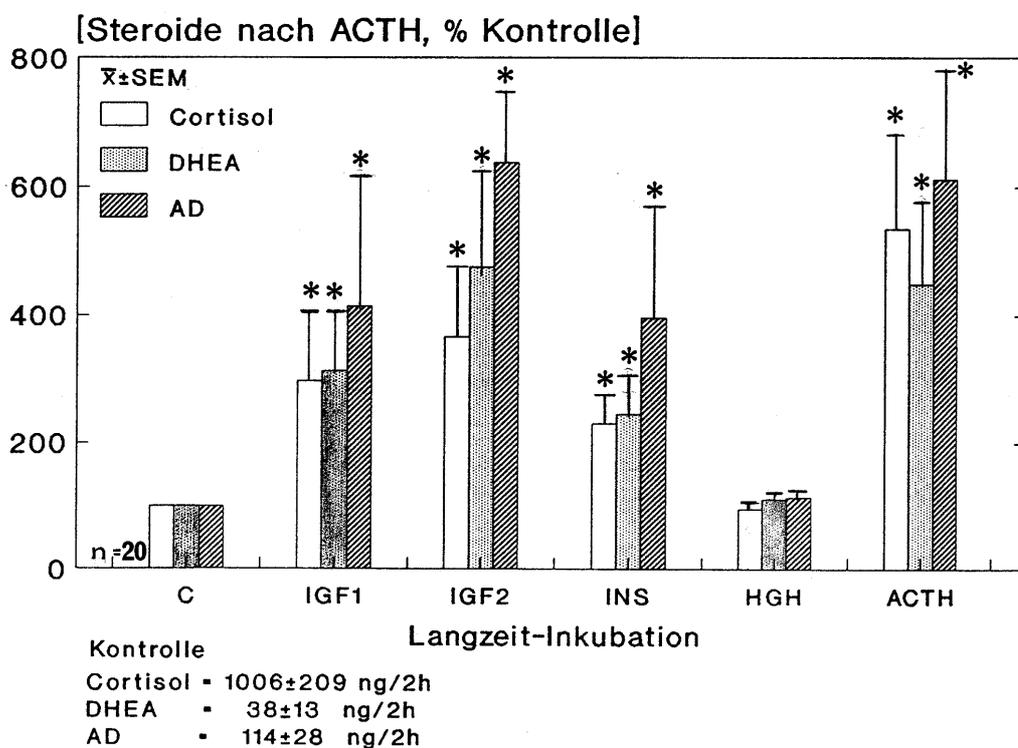


Abbildung 15: Steroidhormon-Antwort auf akute ACTH-Stimulation nach verschiedenen Vorbehandlungen der humanen NNR-Zellen. Nach Präinkubation, wie in Abb. 13 angegeben, werden die Zellen 2 Stunden mit ACTH 1 nmol/l stimuliert, und anschliessend die Steroid-Hormone im Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind in Prozent der ACTH-stimulierten nicht vorbehandelten Kontrollen angegeben. * p<0.05 versus Kontrollen.

2.2.1.2 Wirkungen von IGF-I

Die Langzeitinkubation mit IGF-I (200 ng/ml) bewirkte im Vergleich zu der mindestens 6-fachen Steigerung der Steroid-Produktion durch ACTH nur wenig: die DHEA- Bildung wurde 1,3-fach gesteigert, die des Androstendions 1,5-fach und die des Cortisols 1,6-fach (Abb. 13). Die IGF-I-Vorinkubation jedoch zeigte deutlichere Effekte bezüglich der Steroid-Antwort auf ACTH-Stimulation: im Vergleich zu den nicht vorbehandelten, ACTH-stimulierten Kontrollen wurde vorwiegend die Androstendion-Sekretion gesteigert, um 4,1-fach, und diese lag signifikant höher ($p < 0.01$ bzw. $p < 0.05$) als die ca. 3-fache Zunahme von DHEA und Cortisol (Abb. 15, [180]). Diese Befunde weisen indirekt auf eine bevorzugte Steigerung der 17-20-Lyase Aktivität durch IGF-I hin.

Anhand der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen IGF-I und der akuten Steroid-Antwort auf die ACTH-Stimulation konnte gezeigt werden, dass auch niedrigere, im physiologischen Bereich des freien IGF liegende Konzentrationen noch wirksam sind (Abb. 16). Die minimale Wirkkonzentration des IGF-I-Priming lag bei 1 ng/ml (0,13 nmol/L), die maximale bei ca. 100 ng/ml (13 nmol/L), wobei sich für die Cortisol-Sekretion kein Wirkungsmaximum ablesen liess.

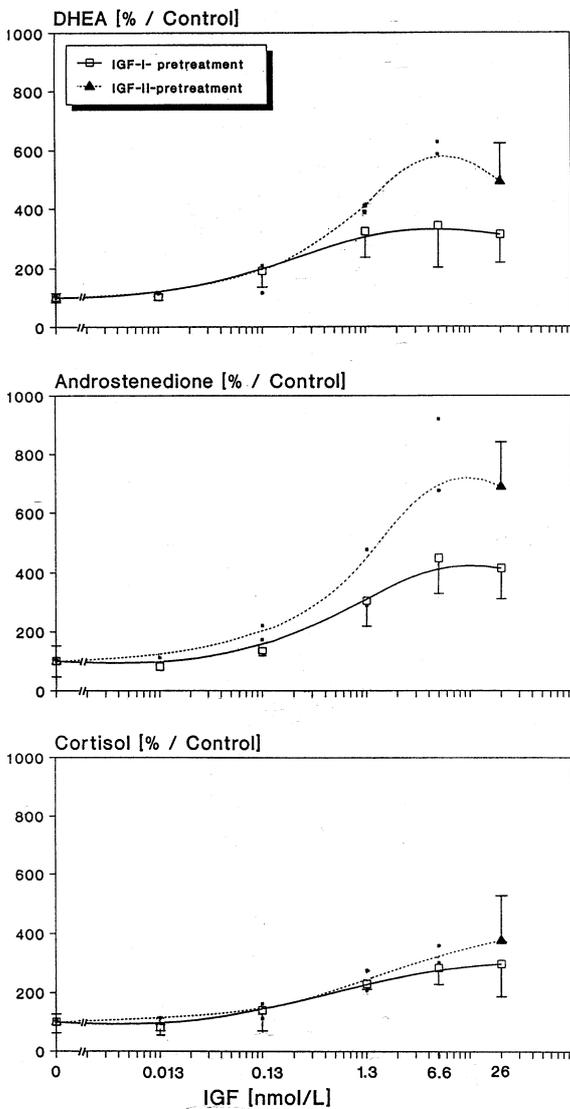


Abbildung 16: Wirkung zunehmender Konzentrationen von IGF-I und IGF-II (0,1 – 200 ng/ml) während der Vorbehandlung von humanen NNR-Zellen auf die ACTH-stimulierte Steroidsekretion. Vorgehen wie in Abb. 13 und 15 angegeben in 3 Experimenten für IGF-I und 2 Experimenten für IGF-II, wobei für die höchste Konzentration Werte aus 10 Experimenten einbezogen wurden.

Die mRNA-Expression der Steroidenzyme wurde durch IGF-I qualitativ ähnlich wie durch ACTH gesteigert, aber schwächer (Abb. 14). Auch IGF-I führte am deutlichsten zur Zunahme der 17-Hydroxylase-Expression sowie zur Steigerung der mRNAs für die 3 β -HSD, den ACTH-Rezeptor und, geringer, der p450_{scc} (Abb. 14). Für die beiden Transkripte der humanen ACTH-Rezeptor-mRNA konnte in einer Arbeit von Lebrethon am gleichen System humaner NNR-Zellen gezeigt werden, dass aus ihrem Anstieg auch eine Zunahme der ACTH-Rezeptor-Zahl folgt [199]. Daher brauchten die ACTH-Rezeptoren hier nicht weiter zu untersucht werden.

Demgegenüber wird in bovinen Zellen durch IGF-I zwar die mRNA für die 17-Hydroxylase gesteigert, aber nicht die Aktivität dieses Enzyms [234]. Es war daher nötig zu bestimmen, welche Enzym-Aktivität durch die IGF-I-Vorinkubation verbessert wird. Dazu wurden die gewaschenen Zellen mit den jeweiligen Präkursoren für die zu untersuchenden Enzymschritte 2 Stunden inkubiert und die Steroidproduktion anschliessend gemessen. Für IGF-I wurde nur Pregnenolon eingesetzt, dessen Umsatz zu DHEA, AD und Cortisol durch IGF-I-Vorbehandlung gesteigert wurde um das 2,5-, 3,1 und 3,5-fache [180]. Daraus folgert zumindest eine Stimulation der 3 β -HSD durch IGF-I. Da IGF-II hinsichtlich seiner Zell-differenzierenden Wirkung über denselben gleichen Rezeptor, Typ 1, wirkt wie IGF-I, wurden weitere Enzymaktivitäten nur mit IGF-II untersucht, s. Kapitel 2.2.1.4.

2.2.1.3 Altersabhängigkeit der IGF-I-Effekte

In Nebennieren älterer Jugendlicher und Erwachsener waren Zona fasciculata und reticularis immer gesondert erkennbar, wurden aber gemeinsam präpariert und inkubiert. Makroskopisch war in Nebennieren von 3 Kindern (2,5, 9 und 13 Jahre) keine Reticularis zu finden, so dass wahrscheinlich überwiegend Fasciculata-Zellen in Kultur gebracht wurden. In Pilotversuchen wurden die Ergebnisse der ACTH-stimulierten Steroidsekretion nach IGF-I-Vorbehandlung dieser NNR-Zellen verglichen mit zeitgleich und unter identischen Bedingungen durchgeführten NNR-Zell-Kulturen von 5 Erwachsenen (Alter \bar{x} = 30,8 Jahre, Tabelle 2). Die Zellen der Kinder sezernierten relativ mehr Cortisol als die der Erwachsenen und relativ weniger DHEA und Androstendion.

Tabelle 2: Altersabhängigkeit der Steroid-Sekretion aus humanen NNR-Zellen in Primärkultur:

x \pm s	< 13 Jahre, n=3		19-40 Jahre, n=5	
	C (ng/5*10 ⁵ Z*2h)	IGF-I (%C)	C (ng/5*10 ⁵ Z*2h)	IGF-I (%C)
Cortisol	1009 \pm 115	156 \pm 20	418 \pm 173	201 \pm 140
DHEA	12 \pm 3	160 \pm 80	33 \pm 18	181 \pm 89
Androstendion	31 \pm 16	240 \pm 80	66 \pm 30	200 \pm 172

Steroidsekretion während 2-stündiger ACTH-Stimulation (mit ACTH 1 nmol/l), aus Zellen von Kindern bzw. Erwachsenen. Z = Zellen am 6. bis 9. Kulturtag. C = Steroidsekretion in akut ACTH-stimulierten, hormon- und serumfrei vorinkubierten Kontrollzellen. IGF = Änderung der ACTH-stimulierten Steroidantwort nach 72-96 h Vorbehandlung mit IGF-I 50 ng/ml, berechnet als % der Kontrollen in identischen Experimenten.

IGF-I bewirkte eine Steigerung der Steroidsekretion im Vergleich zu den Kontrollzellen, und zwar bei Kindern - nur wenig stärker als bei Erwachsenen - vorwiegend des Androstendions. Die Steigerung der Androstendion-Sekretion liegt in der Grössenordnung, die geeignet wäre, die Androgensekretion vom kindlichen auf das Erwachsenen-Niveau anzuheben.

2.2.1.4 Wirkungen des IGF-II

An humanen fetalen Zellen wurde beschrieben, dass IGF-II einen DHEA-Anstieg bewirkt [227], daher wurde dieser Wachstumsfaktor auch in den adulten NNR-Zellkulturen untersucht. Die Ergebnisse der Langzeitinkubation zeigten für IGF-II ganz ähnliche Resultate wie für IGF-I (Abb. 13), nur dass die Wirkung auf die Androstendion-Bildung signifikant grösser war (1,6-facher Anstieg, $p < 0.05$ [180]). Auch die akute Steroidhormon-Antwort auf ACTH wurde durch IGF-II deutlicher als durch IGF-I gesteigert (Abb. 15 und Abb. 16) und lag vor allem für die Androstendion-Bildung signifikant höher (6,9-facher Anstieg, $p < 0.05$). Offensichtlich bewirkte IGF-II auch die Bildung der mRNAs des ACTH-Rezeptors und der 3β -HSD, vorwiegend jedoch, und dosisabhängig, der 17-Hydroxylase (Abb. 14). IGF-II-Wirkungs-Minimum und Wirkungs-Maximum lagen im selben Bereich wie für IGF-I (Abb. 16).

Die zur Bestimmung der Enzym-Aktivitäten durchgeführten Experimente mit Einsatz bestimmter Präkursoren liessen erkennen, dass die Aktivitäten ansteigen, nämlich der 3β -HSD, der 17-Hydroxylase und der 17-20-Lyase, sowie der 21-Hydroxylase und/oder der 11β -Hydroxylase [180]. Zusätzlich gab es Hinweise, dass auch IGF-II bevorzugt die 17-20-Lyase-Aktivität des $p45017\alpha$ -Enzyms steigert, da die akute Sekretion von Androstendion signifikant mehr als die von Cortisol verstärkt wurde.

2.2.1.5 Insulin-Wirkungen

Insulin wurde zunächst in micromolarer Konzentration eingesetzt, in der es als Mitogen in Standard-Zellkulturen benutzt wird. In dieser Konzentration wirkt es nicht nur über seinen eigenen Rezeptor, sondern auch über den Typ-1-IGF-Rezeptor [265]. So wirkt es auf die Steroid-Sekretion der NNR-Zellen wie IGF-I (Abb. 13 - 15), ohne an Bindungsproteine gebunden und dadurch in seiner Wirksamkeit moduliert zu werden [204]. Allerdings war die Zunahme der mRNA-Expression der Steroidenzyme weniger deutlich, als bei den IGFs (Abb. 14). Dies könnte an einer zu geringen Zahl der Experimente liegen, oder an einem anderen Wirkprinzip, weil möglicherweise durch Insulin mehr die Enzymaktivität als die Enzymmenge gesteigert wird.

Unerwartet zeigte sich in einigen Experimenten zur Dosis-Wirkungs-Beziehung, dass Insulin auch in niedrigen Dosen ab 0,5 ng/ml einen - wohl über den eigenen Rezeptor vermittelten - Effekt auf die ACTH-stimulierte Steroidsekretion hat. Die Sekretion von DHEA und Androstendion wurde relativ stärker als die von Cortisol erhöht (Abb. 17). Diese Ergebnisse sind aber noch nicht eindeutig und müssten in weiteren Experimenten überprüft werden. Sie weisen jedoch darauf hin, dass Insulin in physiologischen Konzentrationen über seinen eigenen Rezeptor direkt auf die NNR-Steroidsynthese Einfluss nimmt.

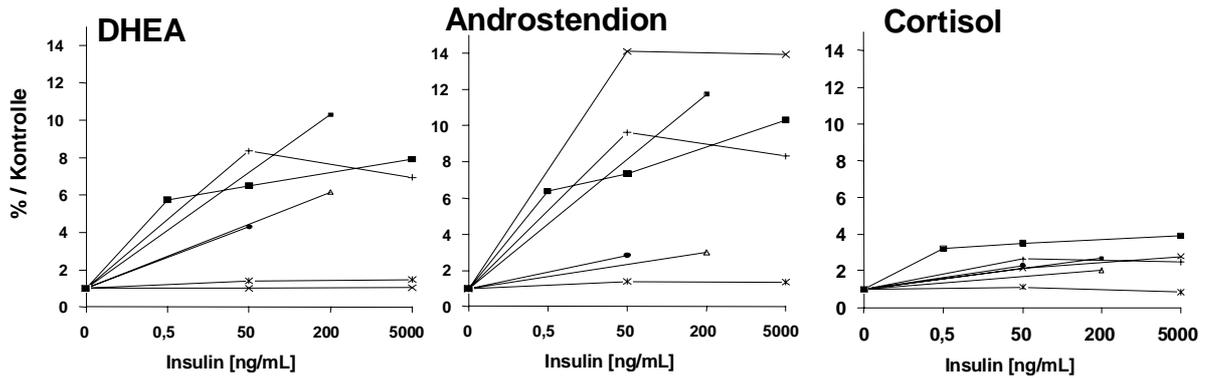


Abbildung 17: Einfluss der Vorinkubation mit Insulin in verschiedenen Konzentrationen auf die ACTH-stimulierte Steroid-Sekretion aus humanen NNR-Zellen, in % der unbehandelten Kontrollen, n=7 Experimente. Die Kurven stellen die Dosis-Wirkungs-Beziehung je eines Experimentes, gemittelt aus Triplikaten pro Versuchsbedingung, dar. Die basale Cortisol-Produktion ist mindestens 10 mal höher als die der Androgene: 583 ± 435 , versus DHEA = $12,2 \pm 5,0$ und Androstendion = $46,2 \pm 43,3$ ng/ $5 \cdot 10^5$ Zellen *2h ($\bar{x} \pm \text{SEM}$).

2.2.1.6 Wachstumshormon-Wirkung

Wachstumshormon in einer recht hohen, aber noch physiologischen Dosis von 100 ng/ml zeigte keinen Effekt auf die NNR-Steroidsynthese (Abb. 13 und 15), und wurde nach den ersten 4 Experimenten nicht mehr eingesetzt.

2.2.2 Autokrines IGF-System der NNR (Publikation II [179])

2.2.2.1 Sekretion von IGF-I und II

Tabelle 3: IGF-Sekretion von humanen adrenocorticalen Zellen (HAC)

Sekretion von			Kontroll- HAC	Behandlung der HAC mit ACTH 10 nmol/L
		n	[ng/ 5×10^5 Zellen x24h]	[Vielfaches der Kontrolle]
IGF-I	0-24h	6	0.41 ± 0.10	2.00 ± 0.13 ★
	72-96h	8	0.62 ± 0.17	3.78 ± 2.84 ★,#
IGF-II	0-24h	9	0.91 ± 0.23	1.59 ± 0.25 ★
	72-96h	10	0.70 ± 0.13	1.47 ± 0.18

★ $p < 0.05$ vs Kontrolle; # = $p < 0.05$ IGF-I vs IGF-II nach 72h ACTH-Behandlung

Die vorliegenden Experimenten demonstrieren, dass adulte humane NNR-Zellen in Primärkultur geringe Mengen IGF-I und IGF-II (Tabelle 3) sezernieren, die während des ersten Inkubations-Tages durch ACTH um das 2- bzw. 1,6-fache stimulierbar sind [179]. Bislang wurde eine 7-fach höhere Sekretion von IGF-II und seine positive Regulation durch ACTH nur in humanen fetalen NNR-Zellkulturen gezeigt [146].

2.2.2.2 Nachweis der IGF- mRNAs

Da bisher die Expression von IGF-I und II-mRNA in Nebennieren von Kindern oder Erwachsenen und ihre Regulation noch nicht näher geprüft wurden (vgl. Kapitel 1.4.4.3.), sollte dies in NNR-Zellkulturen untersucht werden. Eine Testserie an Northern Blots, die 25 – 50 µg direkt aus humanem NNR-Gewebe präparierte RNA enthielten, zeigte, daß eine IGF-II -Expression in adulten humanen NNR nachweisbar ist (Abb. 18). Die mRNA-Spezies von ca. 6,2, 4,8 und 1,6 kb sowie, geringer, 2,0-3,0 kb, ähneln den mit gleicher Sonde in fetalem NNR-Gewebe [118], bzw. in NNR-Zellen [318] beschriebenen. Mit dieser Sonde sind auch in der humanen Leber typische RNAs zu finden. Mit der Ea- IGF-I-Sonde dagegen war nicht nur in NNR-Gewebe, sondern auch in der menschlichen Leber keine IGF-I-Expression nachweisbar, wohl aber in Tumorgewebe. Da die bekannten Transskripte, Ea- und Eb- IGF-I mRNA, eine gewebsspezifische Verteilung zeigen, und Ea- IGF-I in NNR und Leber geringer als Eb- IGF-I exprimiert wird [118], betätigen die negativen Befunde die fehlende Spezifität der Sonde für die in der Leber zu erwartenden RNA-splice-Produkte.

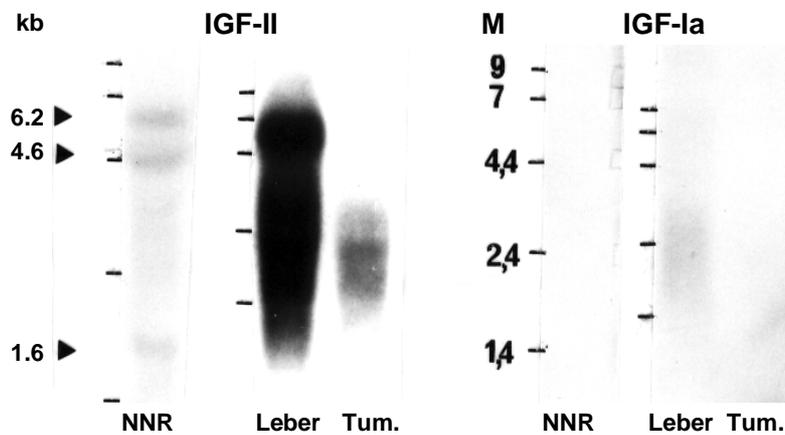


Abbildung 18: Nachweis von IGF-mRNA in Geweben erwachsener Menschen. Hybridisierung von 25 µg RNA direkt aus NNR-Gewebe (Zona Fasciculata und Reticularis) sowie 50 µg Leber- und Nephroblastom-Gewebe, in Northern-Blot-Untersuchungen mit der Ea IGF-I- bzw. der IGF-II-variant-cDNA Sonde [151, 152]. M, Marker in kiloBasen

Auch aus NNR-Zellkulturen gewonnene mRNA ergab nach 2-tägiger Exposition für kein IGF ein Signal In Northern Blots. Mit den in dieser Studie verfügbaren Sonden waren bislang an kultivierten Zellen nur bei sehr hoher IGF-mRNA-Expression positive Ergebnisse in Northern Blots erzielt worden (pers. Mitteilung von M. Jansen, [108, 147, 211, 228]). Da zugleich die Ergebnisse der IGF-Peptid-Messung (Tabelle 3) eine geringe IGF-RNA-Expression nahelegen, müssten für weitere Untersuchungen in NNR-Zellkulturen empfindlichere Methoden wie RT-PCR angewandt werden.

2.2.2.3 Spezifische Bindung von IGF-I

In einem Pilotversuch wurde die IGF-I-Bindung an humane NNR-Zellen mit ¹²⁵J- IGF-I (markiert mit Chloramin T von Dr. Schmidt, Biochemisch-Technologisches Zentrum, Berlin-Buch; Spez. Aktiv. 80 MBq/nmol) in Gegenwart oder Abwesenheit von 10⁻⁶ M unmarkiertem IGF-I untersucht, wie zuvor beschrieben [255]: 5x10⁵ Zellen wurden

inkubiert mit 7×10^6 cpm, davon wurden unter Kontrollbedingungen 3547 cpm spezifisch (gesamte minus unspezifische Bindung) gebunden, und durch 24 h Vorinkubation mit ACTH 10^{-8} M auf 5468 cpm gesteigert. Damit konnte am verwendeten Kultursystem dargestellt werden, daß NNR-Zellen IGF-Rezeptoren besitzen, die wie in bovinen NNR-Zellen durch ACTH reguliert werden.

2.2.2.4 Sekretion und Bedeutung von IGF-Bindungsproteinen

Die Wirkung der IGFs wird u.a. dadurch komplex, dass seine Bindungsproteine (BP) die Bioverfügbarkeit der IGFs beeinflussen. Nun fand sich in den vorliegenden Versuchen, dass adulte humane NNR-Zellen IGFBP-2, -3 und -4 in messbaren Mengen sezernieren, und dass IGFBP-3 und -4 durch IGF-I reguliert werden.

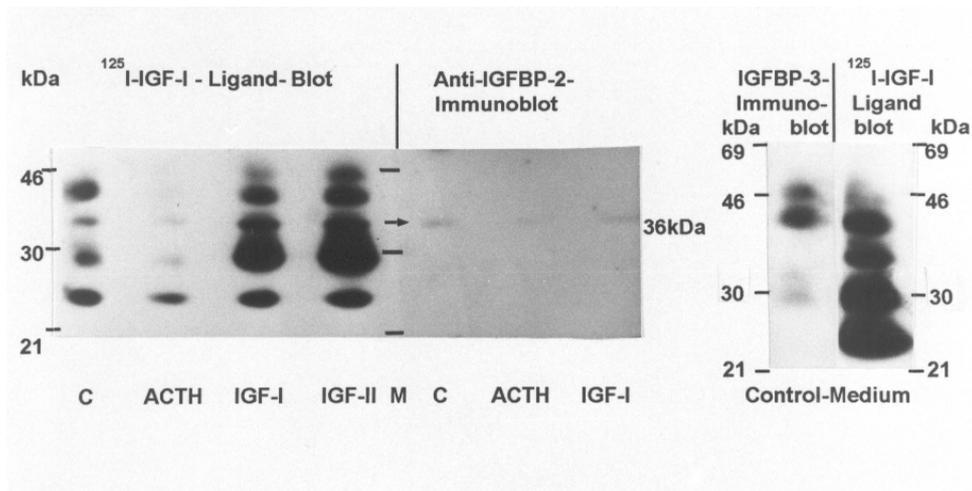


Abbildung 19: IGF-Bindungsprotein-Analyse in 125 J-IGF-I-Liganden-Blots und Immunoblots mit anti-IGFBP-2 und anti-IGFBP-3, aus konzentriertem Medium von 1×10^6 Zellen und 24h, nach 3-tägiger Vorbehandlung wie in Abb. 13 angegeben.

Die im 125 J-IGF-I-Liganden-Blot vom NNR-Zellmedium nachweisbaren 4 IGF-I-bindenden Proteinbanden entsprechen mindestens 3 IGFBPs (Abb. 19), wie mittels insgesamt je 3 Immunoblots aus den identischen Proben und Auftrennungen gezeigt werden konnte: Die 43-46-kDa-Doppelbande entspricht dem glykolysierten IGFBP-3, wie in humanem Serum, und das 29 kDa-Protein ist immunologisch ein IGFBP-3-Fragment. Das 36-kDa-Protein ist immunologisch IGFBP-2. Das 24 kDa-Protein wurde dank des Molekulargewichtes als IGFBP-4 erkannt [41, 337]. IGFBP-1, welches ebenfalls der 29kDa-Bande hätte entsprechen können, war weder mittels ELISA in angereichertem Medium von 1×10^6 Zellen, noch in 3 Immunoblots mit anti-IGFBP-1 nachweisbar. Das IGFBP-3-Fragment von 29 kDa scheint in den NNR durch Proteasen zu entstehen und hat eine herabgesetzte IGF-Bindungsaffinität [27, 87]. Die IGFBPs zeigen eine Organ- und Spezies-spezifische Verteilung (Abb. 20); im humanen NNR-Kulturmedium ist das IGFBP4 am höchsten, im bovinen das IGFBP3.

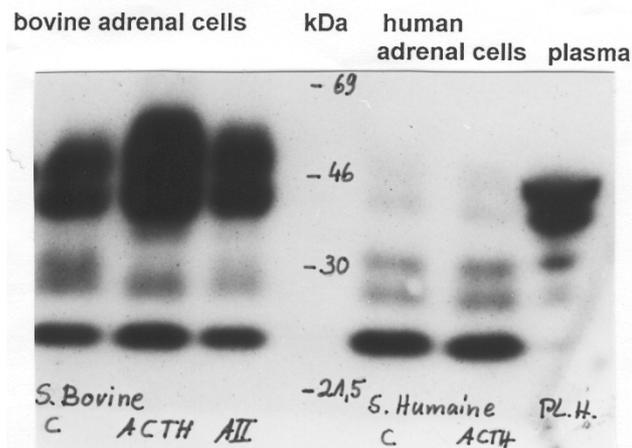


Abbildung 20: Spezies- und Organ-Unterschiede der IGFBP-Sekretion im ^{125}J -IGF-Liganden-Blot. Medium von 1×10^6 NNR-Zellen, bzw. $10 \mu\text{l}$ Plasma. Mitte: Molekulargewichts-Marker.

Tabelle 4: Sekretion der IGF-Bindungs-Proteine (BP) aus NNR-Zellen, analysiert mittels ^{125}J -IGF-I-Liganden-Blot und Densitometrie, $n = 5$ Experimente 0 - 24h und $n = 7$ Experimente 72 - 96h nach Behandlung mit den angegebenen Hormonen, oder ohne Zusätze (Kontrollen), bzw. gemessen im IGFBP-3-RIA, $n=12$. ★ = $p < 0.05$ vs Kontrolle.

		Kontrollen	Behandlung ACTH [10 nmol/L]	von HAC IGF-I [200ng/ml]	mit IGF-II [200ng/ml]
Liganden Blot:		Densitometrie-Einh.	Vielfaches/Kontr.	Vielfaches/Kontr.	Vielfaches/Kontr.
BP43-46	0-24h	43.0 ± 20.0	2.90 ± 1.01	2.35 ± 0.75	2.70 ± 2.20
=BP3Gly.	72-96h	165.0 ± 72.0	1.03 ± 0.42	7.92 ± 5.13 ★	2.87 ± 0.36
BP36	0-24h	64.4 ± 38.8	2.34 ± 0.97	2.73 ± 2.50	2.76 ± 2.73
=BP2	72-96h	121.1 ± 33.6	2.64 ± 1.50	6.88 ± 5.21	1.48 ± 0.21
BP30	0-24h	59.1 ± 28.5	2.01 ± 0.63	2.16 ± 0.57	2.82 ± 2.39
=BP3Fr.	72-96h	158.0 ± 51.4	1.01 ± 0.36	1.16 ± 0.41	1.19 ± 0.41
BP24	0-24h	172.2 ± 127.0	1.74 ± 1.02	0.92 ± 0.01	1.26 ± 0.31
=BP4	72-96h	416.5 ± 106.0	0.82 ± 0.15	0.30 ± 0.10 ★	0.57 ± 0.65
RIA:					
Sekretion von		$\text{ng}/5 \times 10^5$ Zellen $\times 24\text{h}$	Vielfaches/Kontr	Vielfaches/Kontr.	Vielfaches/Kontr
BP-3	48-72h	1.0 ± 0.61	1.18 ± 0.14	1.90 ± 0.17 ★	2.92 ± 0.36 ★

Signifikante Änderungen der IGFBP-Sekretion liessen sich nur durch die Behandlung der NNR-Zellen mit IGF-I nachweisen (Tabelle 4, Abb. 21): IGFBP-3 wurde sowohl im RIA als auch im Liganden Blot (BP43-46) gesteigert. Die Sekretion des IGFBP-4 (BP24) dagegen wurde durch IGF-I reduziert.

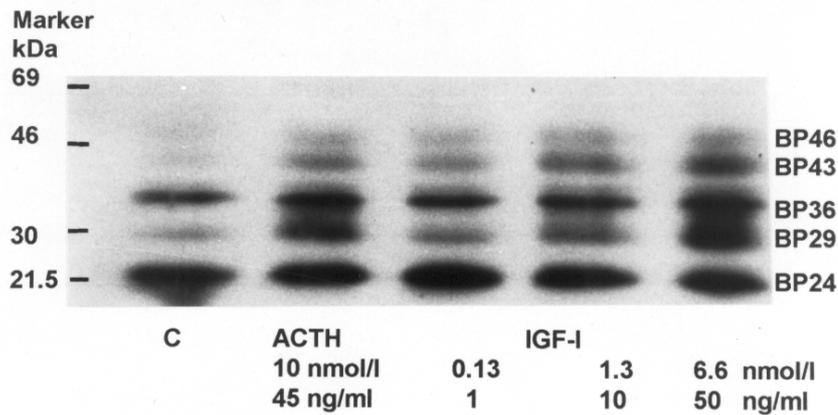


Abbildung 21: Regulation der IGFBP-Sekretion von 1×10^6 humanen NNR-Zellen während der ersten 24 Stunden unter den angegebenen Bedingungen, analysiert im ^{125}I -IGF-Liganden-Blot.

Eine Behandlung von NNR-Zellen mit einem nicht an IGFBPs bindenden IGF-I –Analogon, des(1-3)-IGF-I [109], erzielte keine wesentliche Änderung der IGF-I -Wirkung (Abb. 22). Dieser Befund spricht gegen eine Bedeutung der Bindungsproteine, zumindest im vorliegenden in-vitro-System.

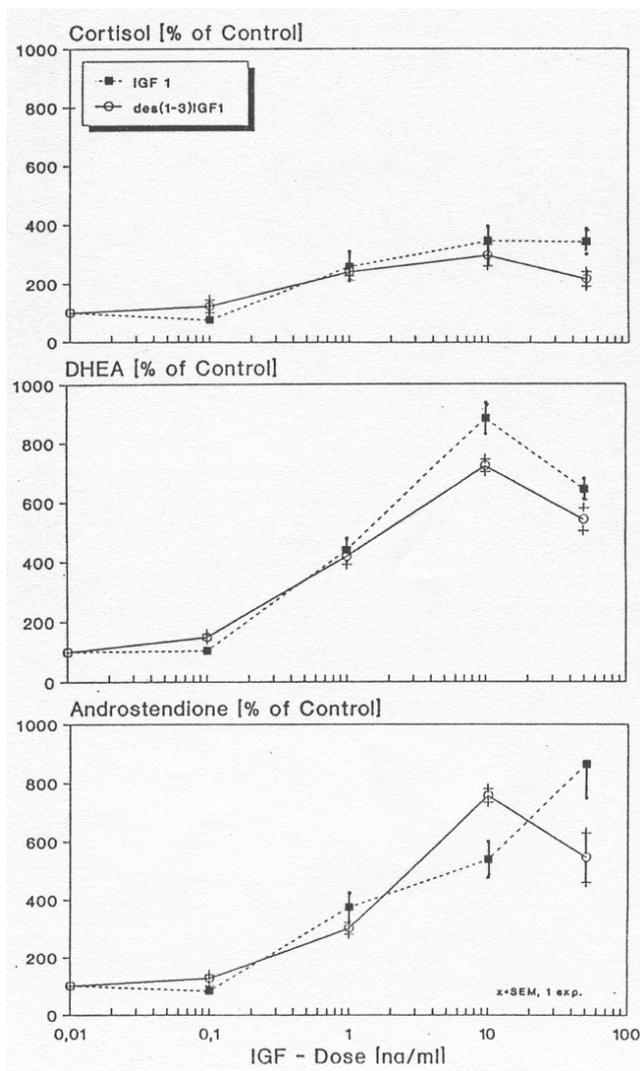


Abbildung 22: Einfluss von IGF-Bindungsproteinen und von IGF-I auf die akute Steroidhormon-Antwort auf ACTH: Parallele Behandlung von humanen NNR-Zellen über 72h mit IGF-I (0,1 – 100 ng/ml, 0,013 – 13 nmol/l) oder, in gleicher Konzentration, mit des(1-3)IGF-I, einem Analogon mit niedriger Affinität für IGFBPs. Mittelwert und SEM von Triplikaten einer Präparation.

3 Beziehungen zwischen NNR-Androgenen und Körpermasse bei gesunden und adipösen Kindern und Jugendlichen (Publikation III [181])

3.1 Methoden

Um die Fragen zu beantworten

1. Ist bei Adipositas die Nebennierenrinden-Androgen-Sekretion vor und während der Pubertät erhöht, im Vergleich zu gleichaltrigen Kontroll-Kindern, und
2. Welchen Zusammenhang gibt es zwischen der Körpermasse, BMI und Grösse, IGF-I, Leptin einerseits und DHEAS und Androstendion andererseits,

haben wir eine Querschnittsstudie an insgesamt 102 Kindern durchgeführt. Es wurden 26 präpubertäre Adipöse und 28 pubertäre Adipöse mit 48 passenden normalgewichtigen Vergleichskindern untersucht (s. Tabelle 5). Die Adipositas wurde bei den präpubertären Kindern definiert als ein BMI von über 3 SDS (alters- und geschlechtskorrigierte Standard-Deviation-Scores (SDS), Züricher Longitudinalstudie [268]) und entsprach einem Relativgewicht von über 120%. Die Pubertären galten dann als adipös, wenn ihr Grössen-bezogenes Relativgewicht 120 % des Sollwertes (Median des Gewichtes pro Grösse) überschritt [121]. Diese Definition war notwendig, weil in dieser Gruppe die Körpergrössen extrem unterschiedlich waren (-2,3 bis +3,3 Grössen-SDS) und der BMI bei den Klein- oder Hochwüchsigen die Adipositas weniger korrekt anzeigte, als das Relativgewicht, wie anderenorts beschrieben [220]. Als Vergleichsgruppe wurden Kinder mit frühbehandelter konnataler Hypothyreose einbezogen, deren normale Entwicklung kürzlich dokumentiert wurde [115], oder Kinder mit familiärem Hochwuchs. Diese wurden bewusst eingeschlossen, da ja die Adipositas selbst zur Wachstumsbeschleunigung führt. Jungen und Mädchen wurden gemeinsam ausgewertet, weil ein signifikanter Geschlechtsunterschied der Hormonspiegel im Mann-Whitney-Test nicht zu finden war.

Grösse, BMI, Pubertätsstadien und Skelettreife wurden mit Standardmethoden bestimmt [113, 268], und, wo möglich, als SDS angegeben. Freies Leptin, wie kürzlich beschrieben [126], sowie IGF-I, DHEAS und AD [181] wurden im RIA ohne Extraktion direkt gemessen. Die Werte waren nicht normalverteilt, und wurden daher mit Median und Streubreite beschrieben, und für die weiteren Berechnungen als Logarithmen eingesetzt. Da alters- und geschlechtsbezogene Normwerte nicht für alle Hormone vorhanden waren, diese jedoch signifikant altersabhängig sind, musste ihre Alterskorrektur mittels Regressionsanalyse von allen Kindern erfolgen. Dazu wurden die Residuen genommen, die für jedes Individuum den Abstand zur Regressionsgraden zwischen dem Alter und dem untersuchten Parameter angeben. Die so erzielten Werte sind mit dem Suffix „res“ gekennzeichnet.

Tabelle 5: Klinische Daten von 102 Kindern mit und ohne Adipositas

Gruppe	Präpubertäre Adipöse	Präpubertäre Kontrollen	Pubertäre Adipöse	Pubertäre Kontrollen
Gesamt	26	26	28	22
Mädchen	16	17	13	13
Jungen	10	9	15	9
Chronol. Alter	8,5 (2,9 – 13,1)	8,0 (2,7 – 11,4)	12,8 (9,1 – 16,1)	12,5 (9,4 – 15,0)
Skelettalter	10,0 (4,0 – 13,8)	8,5 (4,3 – 11,5)	12,5 (8,5 – 18,0)	13,4 (10,8 – 15,5)
Pubes Stad.	1	1	3 (2 – 6)	3 (2 – 5)
B oder G Stad.	1	1	3 (2 – 5)	4 (1 – 5)
Grössen-SDS	2,5* (-2,3 – 4,1)	0,4 (-1,9 – 3,9) ¹	0,3***(-2,3 – 3,3)	2,7 (0,8 – 4,4) ²
Relativgew. %	149***(120 – 182)	103 (86 – 120)	151***(122 – 222)	96 (78 – 118)
BMI-SDS	5,6***(3,1 – 9,5)	0,5 (-0,9 – 2,8)	4,9*** (1,9 – 11,9)	0,7 (-1,5 – 3,4)

B, G = Pubertätsstadium der Brust- bzw- Genitalentwicklung nach Tanner. * und *** p < 0,05, bzw. p < 0,001 signifikant verschieden von der Kontrollgruppe. ¹ 7/26 mit Hochwuchs; ² 19/22 mit Hochwuchs

Die Beziehung zwischen NNR-Androgenen, AD_{res} and $DHEAS_{res}$, und den sie erklärenden Variablen, $Leptin_{res}$, $IGF-I_{res}$, BMI-SDS und Grössen-SDS, wurde mit dem Pearson Korrelationskoeffizient angegeben; sein Quadrat gibt den proportionalen Anteil der erklärenden Variablen an der Variabilität der Androgene an. In den schrittweisen Regressionsmodellen mit 2 erklärenden Variablen wurde der einzelne oder gemeinsame Anteil der Variablen an der Erklärung der Androgenspiegel untersucht.

3.2 Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und BMI, IGF-I sowie Leptin bei präpubertären Kindern.

Vor der Pubertät war in der Adipositas-Gruppe neben dem Relativgewicht und dem BMI die Körpergrösse mit 2,5 SDS signifikant erhöht (Tabelle 5), obgleich auch in der Kontrollgruppe 7 Kinder hochwüchsig waren. Der Leptin-Spiegel war entsprechend dem BMI ($r = 0,71$, $p < 0.0001$) bei den Kindern mit Adipositas deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe und zum Referenzbereich (Tabelle 6). IGF-I hingegen korrelierte mit der Körpergrösse ($r = 0,61$, $p < 0.001$) und lag in der präpubertären Adipositasgruppe signifikant höher als der Median der Kontrollen (Tabelle 6).

Die NNR-Androgene DHEAS und Androstendion waren bei den präpubertären übergewichtigen Kindern signifikant erhöht. Androstendion lag bei 2 Kontrollen mit Hochwuchs über der Altersnorm, daher war die Erhöhung dieses Androgens bei den Adipösen nur signifikant, wenn zur Berechnung die Hochwüchsigen ausgeschlossen wurden (Tabelle 6).

Tabelle 6: Hormon-Serumkonzentrationen der Studiengruppen und Referenzbereiche

	Leptin pmol/l	IGF-I nmol/l	DHEAS umol/l	AD nmol/ml
Präpubertäre Adipöse				
Median	192**	26,4*	2,47**	1,88(*)
Streubreite	41 – 498	11,1 – 55,4	0,61 – 8,1	0,17 – 12,6
n=	26	16	23	22
Präpubertäre Kontrollen				
Median	36,5	17,7	0,48	0,84
Streubreite	12 – 157	7,9 – 55,4	0,21 – 4,54	0,17 – 3,98
n=	26	16	14	13
Normale Referenzwerte				
Alter	8 – 10 J,	2 – 10 J,	2 – 10 J,	3 – 10 J,
Median	19,5	17,4	0,61	0,98
Streubreite	10 – 92	5,1 – 43,2	0,21 – 3,4	0,17 – 2,6
Pubertäre Adipöse				
Median	268**	34,6*	6,63	4,01
Streubreite	55 – 483	14,1 – 69,7	1,06 – 13,6	1,43 – 14,7
n=	27	17	28	22
Pubertäre Kontrollen				
Median	85	56,5	4,56	3,39
Streubreite	21 – 371	27,5 – 84,0	1,01 – 12,07	0,80 – 5,34
n=	22	15	21	18
Normale Referenzwerte				
Alter	Erwachs,	11-15	11-15	11-15
Median	64	38,9	3,95	3,62
Streubreite	17-300	12,3 – 70,7	0,61 – 8,4	0,42 – 8,13

AD = Androstendion. * p < 0.05, ** p < 0.01 signifikanter Unterschied gegenüber Kontrollen; (*) p < 0.05 versus Kontrollen ohne Hochwüchsige; n.b. = nicht bestimmt

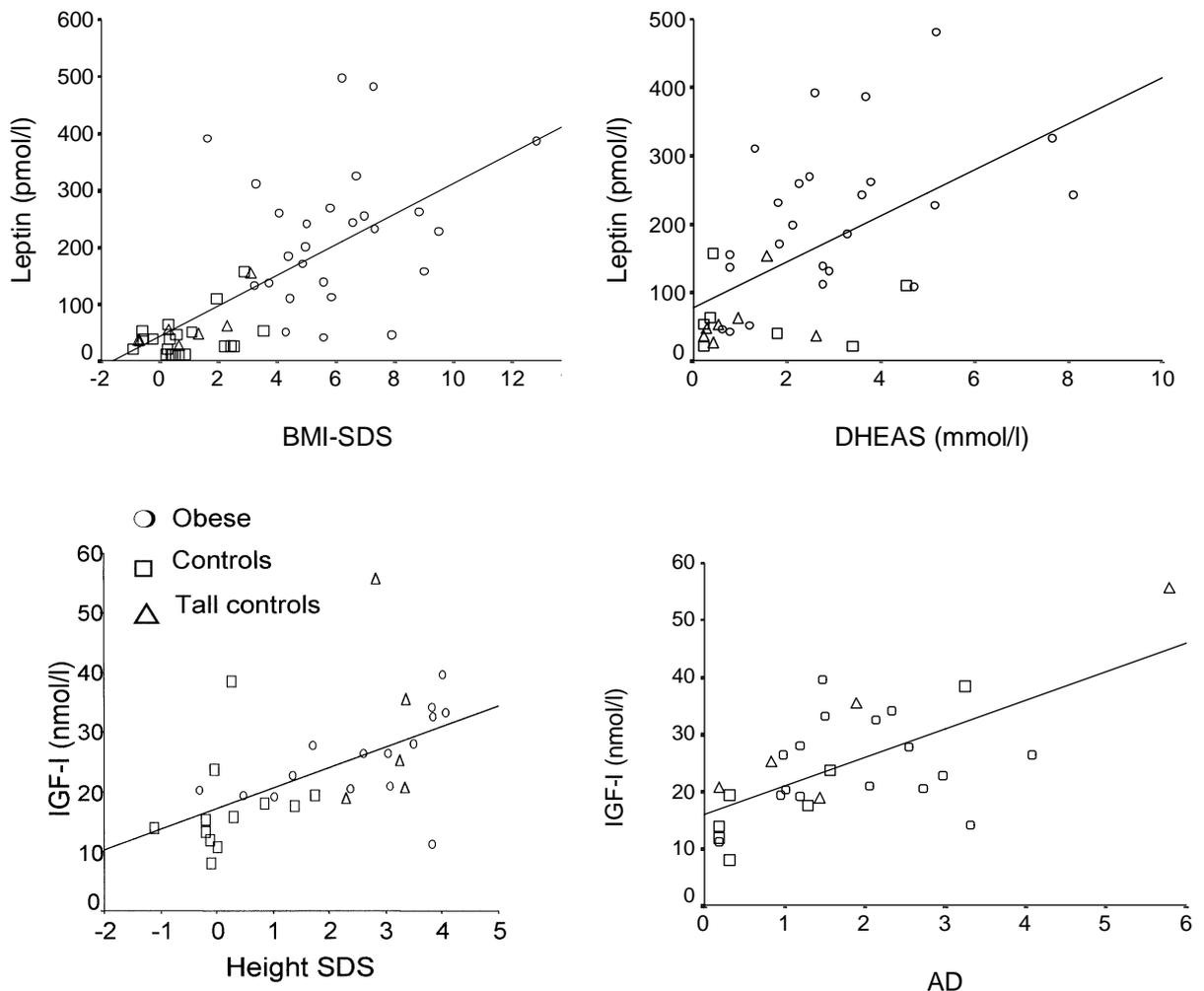


Abbildung 23: Streudiagramme präpubertärer Kinder: Korrelationen von Leptin, ohne Alters-Korrektur, mit BMI-SDS und DHEAS, und von IGF-I mit Grösse und Androstendion. Quadrate = Kontrollen, Dreiecke =hochwüchsige Kontrollen, Kreise = Adipöse

Welcher Zusammenhang besteht zwischen den Androgenen und den Kovariaten bzw. erklärenden Variablen?

Hierzu haben wir Kontrollen und Adipöse gemeinsam untersuchen können, nachdem wir überprüft hatten, dass die Verteilung der Werte homogen war (s. Streudiagramme), um ein breiteres Spektrum des BMI zu erhalten. Vorausgeschickt sei, dass die zuvor berechnete Altersabhängigkeit der meisten Hormone hochsignifikant war. In der kombinierten präpubertären Gruppe erklärte das Alter ungefähr zur Hälfte die Variabilität der IGF-I, DHEAS- und Androstendion- Werte ($R^2 = 48, 55$ bzw. 55% , $p < 0.001$), aber nur 16% der Leptin-Varianz ($p < 0.001$). Im Streudiagramm der Rohwerte (Abbildung 23) sieht man einen schwachen Zusammenhang zwischen Leptin und DHEAS. Im schrittweisen Regressionsmodell (Tabelle 7) mit den alterskorrigierten Werten erklärte $Leptin_{res}$ 12% der $DHEAS_{res}$ Variabilität, jedoch verbesserte die Hinzunahme des BMI-SDS in das Modell die Erklärung der abhängigen Variablen DHEAS auf 26% . Da der BMI-SDS bereits allein für 26% der $DHEAS_{res}$ -Variabilität verantwortlich war, kann gefolgert werden, dass Leptin, zumindest teilweise, das vermittelnde Signal zwischen BMI und der DHEAS-Konzentration darstellt, aber keinen über den BMI-SDS hinausgehenden Zusammenhang hat. Kein anderer Parameter zeigte einen Zusammenhang mit $DHEAS_{res}$. Androstendion hingegen korrelierte signifikant mit IGF-I (Abb. 23, Tabelle 7). Das alterskorrigierte $IGF-I_{res}$ hatte einen Anteil

von 15 % an der Erklärung der AD_{res}-Variabilität, und durch das Hinzufügen des BMI-SDS in dieses Modell wurde die Erklärung auf 28 % gesteigert. Der BMI allein erklärte maximal 15 % des Androstendion-Wertes. Durch Hinzunahme des BMI in das Modell kommen offensichtlich andere, noch nicht definierte Parameter hinzu, welche die Höhe des Androstendions mit bestimmen. Alle übrigen Parameter (Grössen-SDS, Leptin_{res}) standen nicht in signifikantem Zusammenhang mit Androstendion.

Tabelle 7: Regressionsmodelle in der kombinierten Gruppe der präpubertären Kontrollen und Adipösen.

Abhängige Variable	1.erklärende Variable	Modell mit x ₁			2.erklärende Variable x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂				n
		r _{Pea}	%R ²	p		r _{Pea}	%R ²	p	%R ²	p	p _{x1}	p _{x2}	
DHEAS _{res}	Leptin _{res}	0.35	12	*	BMI-SDS	0.51	26	***	26	**	n.s.	*	37
DHEAS _{res}	IGF-I _{res}	0.20	4	n.s.	BMI-SDS	0.47	22	*	23	*	n.s.	*	27
DHEAS _{res}	BMI-SDS	0.51	26	***	Grössen-SDS	0.17	3	n.s.	27	**	**	n.s.	37
AD _{res}	Leptin _{res}	0.25	6	n.s.	BMI-SDS	0.28	8	n.s.	9	n.s.	n.s.	n.s.	35
AD _{res}	IGF-I _{res}	0.39	15	*	BMI-SDS	0.39	15	*	28	*	*	n.s.	27
AD _{res}	BMI-SDS	0.28	8	n.s.	Grössen-SDS	0.20	4	n.s.	11	n.s.	n.s.	n.s.	35

res = Residuum des Bezugswertes, s. Kapitel 3.1. x₁, x₂ = 1. und 2. in das Regressionsmodell eingebrachte erklärende oder unabhängige Variable,

r_{Pea} = Pearsons Korrelations-Koeffizient; %R² = Quadrat von r_{Pea} in Prozent, gibt den Anteil der Variabilität der abhängigen Variablen an, der durch die 1. oder die 2. unabhängige Variable erklärt wird, oder durch beide gemeinsam; p = zugehörige Signifikanz im Fettdruck: *, **, *** =, p < 0.05, < 0.01, < 0.001; n.s. = nicht signifikant;

p_{x1} = Signifikanz durch Einfügen der 1. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 2. schon enthalten war,

p_{x2} = Signifikanz durch Einfügen der 2. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 1. schon enthalten war,

n = Anzahl der für die Regressionsanalyse zur Verfügung stehenden Daten.

3.3 Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und BMI, IGF-I sowie Leptin bei pubertären Kindern und Jugendlichen.

Die Gruppen der pubertären Adipösen und Kontrollen zeigten sehr grosse Streuungen. In der pubertären Adipositas-Gruppe war die Körpergrösse im Durchschnitt nicht mehr erhöht, sondern, wie in der Literatur beschrieben [61, 85], mit 0,3 SDS normal (Tabelle 5). Die Körpergrösse der Kontrollen war erhöht, so dass trotz des normalen Relativgewichts der BMI bei einigen über 2 SD lag (Tabelle 5), wie in Kapitel 3.1. erläutert.

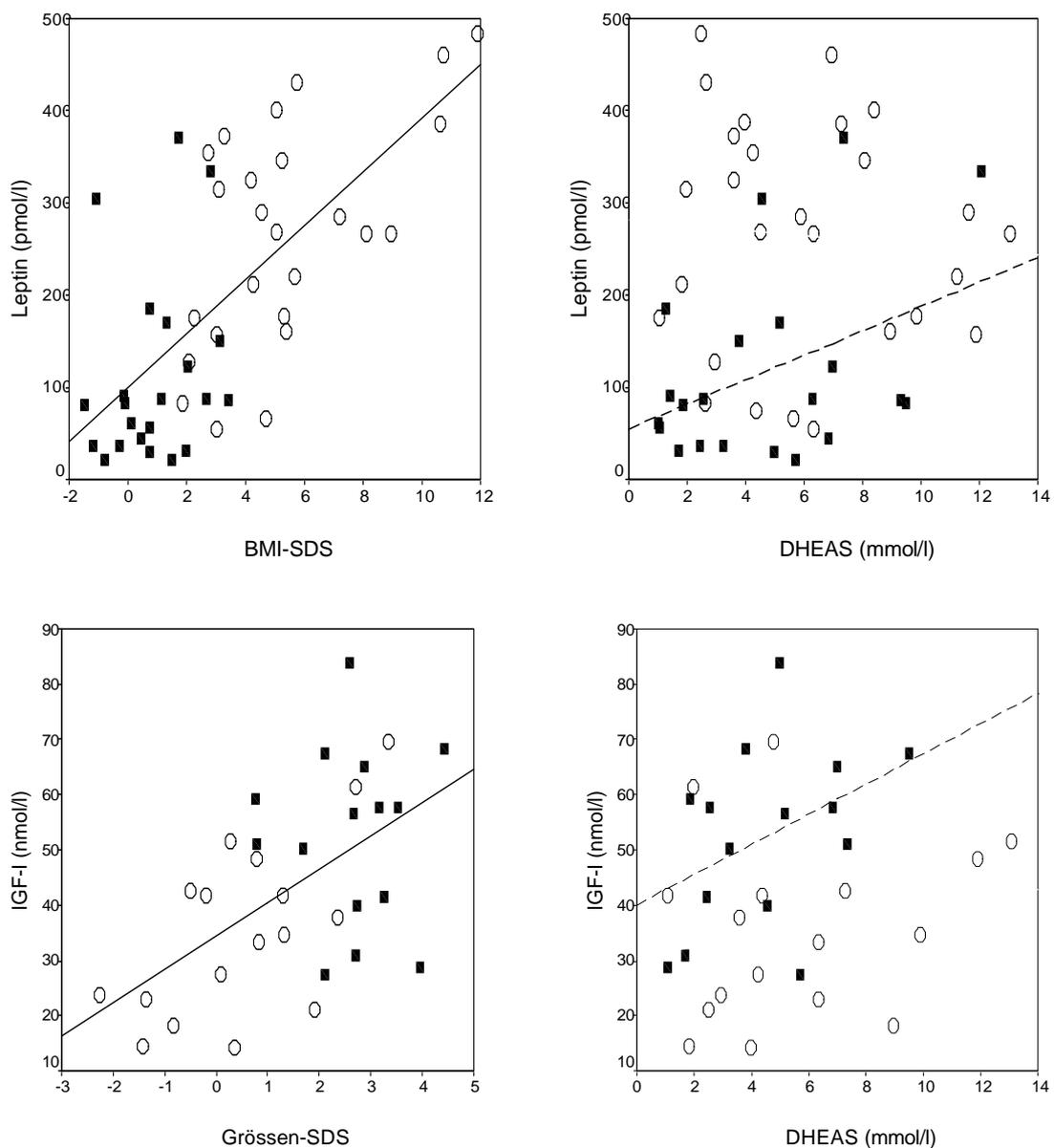


Abbildung 24: Streudiagramme der pubertären Kinder und Jugendlichen: Korrelationen von Leptin bzw. IGF-I, ohne Alters-Korrektur, mit BMI-SDS bzw. Grössen-SDS und DHEAS, durchgezogene Regressionsgerade = Gesamtgruppe, gestrichelte Regressionsgerade = Kontrollgruppe allein. Quadrate = hochwüchsige Kontrollen, Kreise = Adipöse.

Dem BMI als Surroat der Fettmasse entsprechend war bei den Kindern mit Adipositas der Leptin - Spiegel erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. IGF-I hingegen war in der Pubertät bei Adipositas nicht erhöht, im Vergleich zum Referenzbereich, aber bei den Pubertären Kontrollen, die mehrheitlich grosswüchsig waren, hoch. Androstendion lag im oberen Normbereich bei den Adipösen, und die DHEAS-Werte waren in beiden Gruppen eher hoch, doch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

In der pubertären Gruppe war die Heterogenität so gross, dass die Regressionen getrennt für die Adipösen und die Vergleichskinder gerechnet werden mussten (Abbildung 24 und Tabelle 8 a und b). In der Adipositas-

Gruppe fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge (Tabelle 8 a).

Tabelle 8: a) Pubertäre adipöse¹ Kinder und Jugendliche

Abhängige Variable	1.erklärende Variable x ₁	Modell mit x ₁			2.erklärende Variable x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂				n
		r _{Pea}	%R ²	p		r _{Pea}	%R ²	p	%R ²	p	p _{x1}	p _{x2}	
DHEAS _{res}	Leptin _{res}	0.08	1	n.s.	BMI-SDS	0.31	10	n.s.	10	n.s.	n.s.	n.s.	25
DHEAS _{res}	Grössen-SDS	0.18	3	n.s.	IGF-I _{res}	0.22	5	n.s.	5	n.s.	n.s.	n.s.	17
AD _{res}	Leptin _{res}	-0.08	1	n.s.	BMI-SDS	0.13	2	n.s.	4	n.s.	n.s.	n.s.	22
AD _{res}	BMI-SDS	0.31	9	n.s.	IGF-I _{res}	-0.33	11	n.s.	20	n.s.	n.s.	n.s.	12

¹ Die beiden Subgruppen der normalen und der adipösen Kinder während der Pubertät mussten getrennt berechnet werden, weil ihre Daten zu heterogen für eine kombinierte Regressionsanalyse war. Siehe Tabelle 7 für weitere Erklärungen.

Tabelle 8: b) Pubertäre Kontroll-Gruppe.

Abhängige Variable	1.erklärende Variable x ₁	Modell mit x ₁			2.erklärende Variable x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂				n
		r _{Pea}	%R ²	p		r _{Pea}	%R ²	p	%R ²	p	p _{x1}	p _{x2}	
DHEAS _{res}	BMI-SDS	0.64	41	0.00	Leptin _{res}	0.39	15	0.08	42	0.01	0.01	n.s.	21
DHEAS _{res}	Grössen-SDS	0.51	26	0.05	IGF-I _{res}	0.54	29	0.04	29	n.s.	n.s.	0.05	15
AD _{res}	Leptin _{res}	0.22	5	n.s.	BMI-SDS	0.51	26	0.03	26	n.s.	n.s.	0.05	18
AD _{res}	IGF-I _{res}	0.49	24	0.08	Grössen-SDS	0.31	10	n.s.	28	n.s.	n.s.	n.s.	14

Siehe Tabelle 7 für weitere Erklärungen.

Bei den meist hochwüchsigen Vergleichskindern waren ähnliche Zusammenhänge wie in der Präpubertät zu beobachten: DHEAS_{res} war signifikant mit dem BMI-SDS korreliert und erklärte 41 % seiner Variabilität; auch hier änderte sich der Zusammenhang nicht durch Einfügen von Leptin_{res} in das Modell, welches allein 15 % erklärte. Androstendion_{res} war gleichfalls zu 26 % durch den BMI-SDS allein erklärt, hier gab es jedoch keinen additiven Effekt mit IGF-I_{res}, obgleich dieses wie bei den Präpubertären recht eng mit Androstendion korreliert war. Auf Grund der kleinen Fallzahlen waren für einige Zusammenhänge nur Trends (0.1 > p > 0.05) zu erkennen (Tabelle 8 b). Obgleich die mehrheitlich hochwüchsige Kontrollgruppe nur einen Teil des normalen Spektrums repräsentiert, kann an ihr gezeigt werden, dass hohe IGF-I – und Leptin-Spiegel mit hohen NNR-Androgenen, zumindest DHEAS, zusammenhängen.

4 Androgenerhöhung trotz hypothalamischen Defektes beim Prader-Labhart-Willi-Syndrom (Publikation IV [172])

4.1 Methoden

Der Frage zum Zusammenhang zwischen Hyperandrogenämie bei Prader-Labhart-Willi-Syndrom (PWS) und Adipositas-assoziierten metabolischen und endokrinen Veränderungen wurde an einer Gruppe von 23 Kindern und Jugendlichen mit PWS im Alter von im Mittel 5,6 Jahren (0,5 – 14,6 Jahren) nachgegangen. Der Nachweis des typischen Imprinting Defektes des paternalen Chromosoms 15, mit Deletion im Bereich 15q11-13, uniparentaler maternaler Disomie oder Mutation im Imprinting-Center, bestätigte molekulargenetisch das PWS. In dieser Gruppe war es auch möglich, longitudinal (0, 12 und 42 Monate) den Einfluss der Wachstumshormon-Behandlung (8 mg / m² und Woche, entsprechend ca. 0,037 mg / kg und Tag) und der konsekutiv ansteigenden IGF-I-Spiegel auf die Androgene zu untersuchen [172]. Die Wirkung des Wachstumshormons auf Körperzusammensetzung [79], Wachstum [78], Blutfette und Fettverteilung [177] sowie die Insulin-Sekretion [171] wurde in dieser Gruppe bereits zuvor beschrieben. In dieser Studie wurde grundsätzlich gleich wie in der Studie an gesunden Kindern vorgegangen (vgl. Kapitel 3.1.), jedoch Gesamt-Leptin [33] statt des freien Leptin gemessen, und folgende Parameter zwischen 8 und 9 Uhr morgens zusätzlich bestimmt:

- DHEA als drittes Androgen, um die Δ 5-Androgenproduktion unabhängig von der Sulfatierung zu erfassen,
- Nüchtern-Insulin und Glucose,
- HOMA-R, das Surrogat der Insulin-Resistenz [225] und
- Cortisol, um mögliche Änderungen der Glukokortikoid-Achse zu erfassen, sowie
- die Fett- und Magermasse mittels DEXA, wie zuvor beschrieben [79].

Daten von Mädchen und Jungen konnten gemeinsam ausgewertet werden, weil die Pubertätsentwicklung, wenn überhaupt, nicht weiter als bis zum Stadium 2 - 3 vorangeschritten war, und Geschlechtsunterschiede nicht signifikant waren. Bei Patienten mit PWS ist die Blutentnahme technisch schwierig, und es gelang daher nicht, für alle Bestimmungen von jedem Patienten ausreichend Blut zu erhalten. Die Werte wurden anhand der in den untersuchenden Labors üblichen alters- und geschlechtsabhängigen normalen Referenzwerte beurteilt. Die statistischen Auswertungen und Regressionsanalysen wurden genauso vorgenommen, wie bei den gesunden Kindern beschrieben (Kapitel 3.1.). Zusätzlich sollte bei PWS der Einfluss der Wachstumshormon-Behandlung auf die Androgene untersucht werden. Hierbei wurde geprüft, ob der longitudinale Anstieg der Androgene grösser ist, als die durch das voranschreitende Alter bedingte Steigerung. Dazu wurden auch die 12- und 42-Monatswerte mit derselben Regressionsgleichung für das Alter normalisiert, die bei Therapiebeginn erstellt worden war, und damit traten nur die Ergebnisse als signifikant in Erscheinung, die von der Altersprogression abwichen [172].

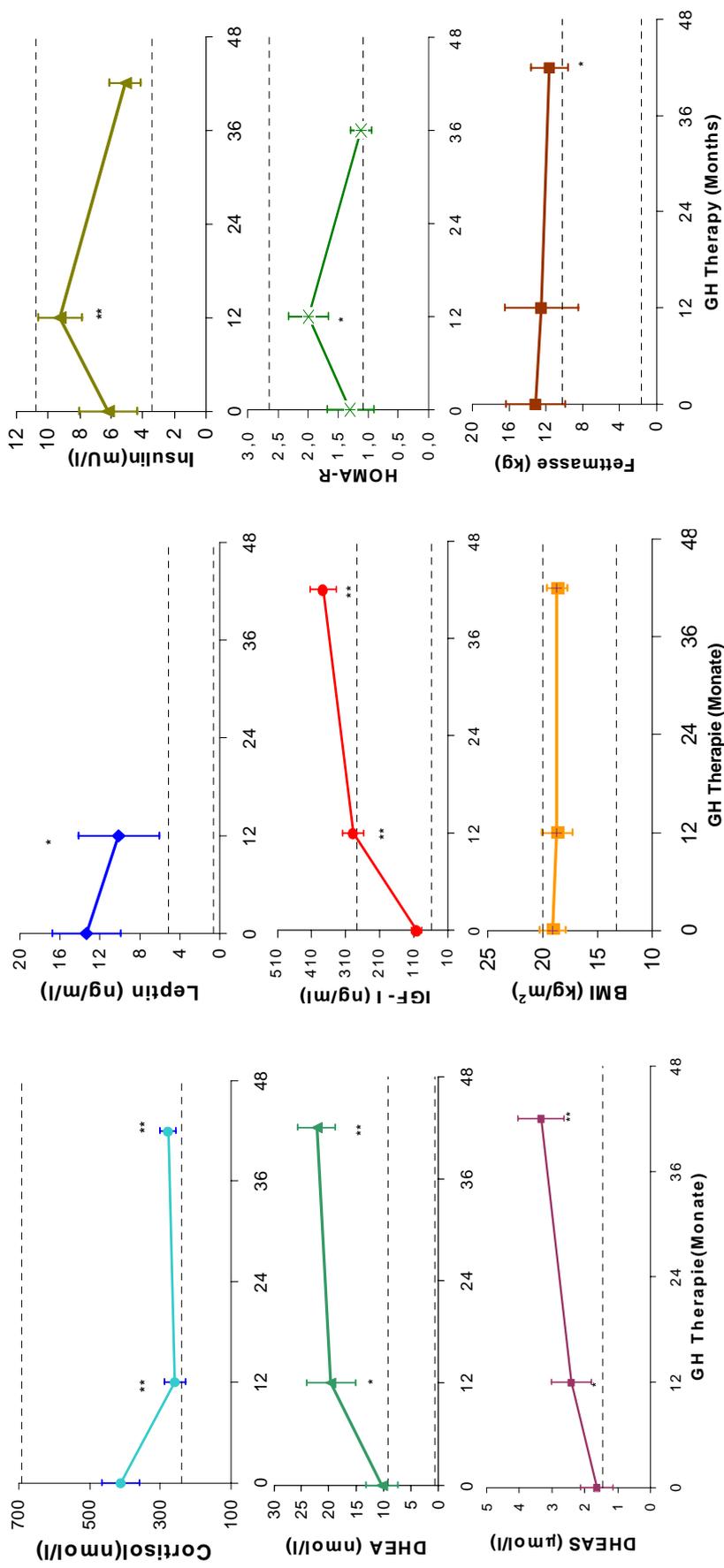


Abbildung 25: Verlaufsdarstellung der klinischen und hormonellen Parameter von 23 Kindern mit PWS vor und unter Wachstumshormontherapie. Mittelwerte \pm SEM. Gestrichelte Linien = obere bzw. untere Grenze des Normbereiches. *, ** =, p<0.05, <0.01 im Vergleich zum Wert vor Therapie.

4.2 Klinische und hormonelle Parameter bei PWS vor und unter Wachstumshormontherapie

Eine prämatüre Pubarche wiesen 1 Mädchen mit PWS vor Therapiebeginn und 2 Kinder unter Therapie auf (5,2 bzw. 10,5 %). Die Inzidenz ist höher, wenn die unter 3-jährigen ausgeschlossen werden, bei denen eine idiopathische prämatüre Adrenarche fast nie auftritt (9,1 unbehandelt bzw. 18,2 % behandelt). Wie aus den Fehlerbreiten in den Diagrammen (Abbildung 25) ersichtlich, lagen viele Werte vor Therapie oberhalb der Altersnorm, 47 % der DHEAS und 35 % der DHEA-Proben. Der Anteil der erhöhten Werte stieg nach 1 Jahr auf 53 bzw 63 % an, bzw. auf 53 und 72 % nach 3,5 Jahren.

Aus der alterskorrigierten, auf die Regressionsgerade vor Therapie bezogenen Regressionsanalyse ergab sich, dass nur in Bezug auf DHEA eine signifikante Veränderung durch die Wachstumshormon-Therapie selbst zu erkennen war. Der DHEAS-Anstieg hingegen ist als altersbedingt zu werten (Tabelle 9 a). Um zu untersuchen, welche Faktoren die Androgen-Veränderungen zu den 3 Zeitpunkten jeweils erklären können, wurden weitere Regressionsanalysen mit den Kovariaten durchgeführt (s. 4.3.). Unerwartet fielen die Cortisolspiegel ab während GH-Therapie, an die untere Normgrenze. Dies spricht entweder für eine Zunahme der Metabolisierung des sezernierten Cortisol durch die bekannte GH-induzierte Aktivierung der 11- β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II (11- β HSD-II), die Cortisol zu Cortison inaktiviert [307], oder für eine verminderte Cortisol-Produktion, was wir im Rahmen des vorliegenden Untersuchungsprotokolls nicht prüfen konnten.

Tabelle 9: a) NNR-Hormone von Kindern mit PWS (abhängige Variablen, Mittelwert \pm SEM)

	Referenzbereich [€]	Vor Therapie		12 m GHT		42 m GHT [§]	
		6-9 J. weibl.&männl.		n		n	
DHEAS nmol/L	<1460	1630 \pm 500	19	2410 \pm 610 ^{n.s.}	19	3340 \pm 710 ^{n.s.}	14
DHEA nmol/L	0.7 – 9.1	10.2 \pm 2.9	17	19.6 \pm 4.5 ^(#)	19	22.2 \pm 3.5 [#]	15
AD nmol/L	0.3 – 1.7	3.3 \pm 0.83	6	2.38 \pm 0.5	18	3.3 \pm 0.53	15
Cortisol nmol/L	240 – 690	440 \pm 53	16	260 \pm 30 ^{###}	18	270 \pm 20 ^{##}	17

[€] = Referenzbereiche des Instituts für Pädiatrische Endokrinologie, Basel; [§] = keine signifikanten Änderungen zwischen 12 und 42 Monaten unter GH-Therapie; ^(#), [#], ^{##}, ^{###}, ^{n.s.} p = 0.06, <0.05, <0.01, <0.001 bzw. nicht signifikant, geben an, ob die Residuen der Hormone bei 12 und 42 Monaten, wenn sie für das Alter vor Therapie korrigiert wurden, sich signifikant von den Werten vor Therapie unterscheiden, geprüft im gepaarten t-Test.

Die Kovariaten zeigten einige für das PWS typische Normabweichungen [79]. Die Fettmasse war vor Therapie im Mittel erhöht, auf 3,14 SD, verglichen mit niederländischen Normwerten [34], und normalisierte sich auf 0,95 SD und 1,23 SD unter 12 und 42 Monaten GH-Therapie. Die relative Fettmasse blieb aber auch unter Therapie an der oberen Normgrenze (43,7 %, 29,6 % bzw. 24,3 %), da die Magermasse relativ niedrig war (-2,95, -1,79 bzw. -1,33 SD). Aufgrund dieser Konstellation, und weil zudem die Körpergröße verringert war (-1,92, -0,98 bzw. -0,36 SD), zeigte der BMI bei diesen Patienten durchweg Normwerte an (1,2, 1,03 bzw. 1,03 SD und Ab. 25), im Vergleich zu deutschen Referenzen [33]. Die BMI- Abnahme unter Therapie war daher auch nur gering, aber signifikant (Tabelle 9b). Den anthropometrischen Veränderungen unter Therapie entsprechend fiel Leptin signifikant ab, und IGF-I stieg an (Abbildung 25, Tabelle 9 b). Nüchtern-Insulin und die Insulinresistenz stiegen

nur vorübergehend signifikant an, und lagen im 4. Therapiejahr wieder wie zu Beginn im unteren Normbereich, trotz der überdurchschnittlich hohen Fettmasse.

Tabelle 9: b) Hormonelle und anthropometrische Kovariaten von Kindern mit PWS (Mittelwert \pm SEM)

		Referenzbereiche	Vor Therapie		12 m GHT		42 m GHT §	
		6-9 J. weibl.&männl.		n		n		n
BMI	kg/m ²	16.55 \pm 2.07 [33]	19.1 \pm 1.2	23	18.7 \pm 1.4 ^{###}	23	18.7 \pm 0.93 ^{###}	19
Fettmasse [£]	kg	5.89 \pm 4.3 [82, 83]	13.1 \pm 3.25	16	12.5 \pm 4.0 [#]	16	11.6 \pm 2.0 [#]	13
IGF-I	ng/mL	161 \pm 61 [336, 338]	101 \pm 15	23	287 \pm 30 ^{###}	22	375 \pm 38 ^{###}	17
Leptin	ng/mL	2.51 \pm 1.16 [33]	13.4 \pm 3.4	23	10.1 \pm 4.0 ^{###}	12	-	
Insulin	mU/L	7.10 \pm 3.70 [193]	6.18 \pm 1.84	18	9.26 \pm 1.40 ^{###}	19	5.13 \pm 1.00 ^{#, ††}	16
HOMA-R	&	1.48 \pm 0.46 [225]	1.30 \pm 0.39	15	1.99 \pm 0.33 [#]	13	1.12 \pm 0.17 ^{n.s.\$}	14

#, ##, ###, n.s. siehe Tabelle 9 a), £ = Daten der Körperzusammensetzung detailliert beschrieben in [79]; †, †† = Signifikanz der Unterschiede zwischen Residuen nach 42 Monaten und nach 12 Monaten, mit für das Alter vor Therapie korrigierten Residuen im gepaarten t-Test berechnet; & = Index der Insulin-Resistenz, HOMA-R = $\text{Ins [mU/L]} / 22.5 \cdot e^{-\ln \text{Gluc [mmol/l]}}$, \$ = Werte nach 36 Monaten GH-Therapie.

4.3 Zusammenhänge zwischen NNR-Androgenen und Körperzusammensetzung, IGF-I, Insulin sowie Leptin beim PWS

DHEAS_{res} zeigte vor Therapie eine signifikante Korrelationen zu Insulin_{res} bzw. der Insulinresistenz, HOMA-R_{res}, aber nicht zu Parametern der Körpermasse (Tabelle 10), Leptin_{res} oder IGF-I_{res}. Im multivariaten Regressionsmodell blieb der Zusammenhang zwischen Insulin_{res} und DHEAS_{res} weitgehend unverändert (Tabelle 11), und erklärte nicht signifikant mehr als 34 % der DHEAS-Variabilität, auch wenn BMI_{res}, Fettmasse_{res}, IGF-I_{res} oder Leptin_{res} hinzugefügt wurden. HOMA-R_{res} als Surrogat der Insulinresistenz erklärte allein sogar 42 % des DHEAS_{res}, und im multivariaten Modell änderte sich hier auch nichts durch Einbezug der vorgenannten Parameter. Dies bedeutet, dass vorwiegend DHEAS, deutlicher als DHEA (Tabelle 10 und 11), mit der Höhe der Insulin-Spiegel zusammenhängt.

DHEA_{res} vor Therapie zeigte eine deutliche Korrelation sowohl zu IGF-I_{res} als auch zu HOMA-R_{res}, sowie eine etwas geringere zu Leptin_{res} (Tabelle 10 a), und nur einen Trend zu Insulin_{res}. Die wichtigste additive Wirkung ergab sich aus dem multivariaten Regressionsmodell mit IGF-I_{res} und HOMA-R_{res} (Tabelle 11 a), die allein je ca. 32 % der DHEA-Variabilität erklärten, und gemeinsam 60 % ($p < 0.01$, $n = 13$). Auch das multivariate Modell mit IGF-I_{res} und Insulin_{res} war mit 57 % ähnlich signifikant ($p < 0.004$, $n = 17$). Dies kann bedeuten, dass Insulin und IGF-I über unterschiedliche Mechanismen mit DHEA assoziiert sind. Die anthropometrischen Variablen sowie weitere Kombinationen der Kovariaten wiesen keinen Zusammenhang mit der DHEA-Variabilität auf.

Tabelle 10: a) Korrelationsanalysen bei Kindern mit PWS vor Therapie.

0 Monate	DHEAS _{res}			DHEA _{res}			Cortisol _{res}		
	r	p	n	r	p	n	r	p	n
BMI _{res}	.00	n.s.	19	.33	n.s.	17	-.39	n.s.	16
Fettmasse _{res}	.00	n.s.	14	.22	n.s.	14	-.40	n.s.	14
IGF-I _{res}	.22	n.s.	19	.58	.016	17	-.30	n.s.	16
Leptin _{res}	.20	n.s.	19	.49	.046	17	-.33	n.s.	16
Insulin _{res}	.58	.017	16	.41	.065	17	-.28	n.s.	16
HOMA-R _{res}	.65	.018	13	.57	.045	13	-.32	n.s.	13

_{res} = Residuum des Bezugswertes, s. Kapitel 3.1. r = Pearsons Korrelationskoeffizient, p = assoziierte Signifikanz, n = Anzahl der für die Korrelationsanalysen zur Verfügung stehenden Werte, n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 10: b) Korrelationsanalysen bei Kindern mit PWS nach 12 Monaten GH-Therapie.

12 Months	DHEAS _{res}			DHEA _{res}			AD _{res}			Cortisol _{res}		
	r	p	n	r	p	n	r	p	n	r	p	n
BMI _{res}	-.10	n.s.	19	.14	n.s.	19	.00	n.s.	18	-.22	n.s.	18
Fettmasse _{res}	-.10	n.s.	14	.14	n.s.	14	.27	n.s.	14	-.48	.082	14
IGF-I _{res}	.30	n.s.	18	.10	n.s.	18	.51	.036	17	-.10	n.s.	17
Leptin _{res}	.20	n.s.	10	.82	.004	10	.52	.15	9	.28	n.s.	9
Insulin _{res}	.10	n.s.	16	.00	n.s.	16	.00	n.s.	15	-.40	n.s.	15
HOMA-R _{res}	.10	n.s.	10	.14	n.s.	11	.00	n.s.	10	-.23	n.s.	10

Siehe Tabelle 10a) für Erläuterungen.

Nach einem Jahr Wachstumshormon-Behandlung (Tabelle 10 b und 11 b) war DHEAS_{res} nicht mehr mit einer unabhängigen Variablen assoziiert. DHEA_{res} hingegen war nun nur noch mit Leptin_{res} (r = 0,82, Tabelle 10 b) korreliert. Erneut brachte das Hinzufügen des BMI_{res} keine Verbesserung der Erklärung für die DHEA_{res}-Variabilität, ebensowenig wie für die des Insulin_{res}. Alle anderen Parameter waren ohne Bedeutung. Nun standen auch genug Androstendion-Werte zur Verfügung, um die Korrelationen zu prüfen: IGF-I_{res} war mit Androstendion_{res} korreliert (r = 0,51), nicht aber der BMI_{res} oder die anderen anthropometrischen und hormonellen Variablen.

Nach 42 Monaten fanden sich keine signifikanten Korrelationen mehr zwischen NNR-Androgenen und unabhängigen Variablen.

Der Zusammenhang zwischen Körpermasse bzw. Fettmasse und Kovariaten bei den PWS-Patienten war geringer, als in der Untersuchung an gesunden Kindern gefunden, abgesehen von einer hochsignifikanten positiven Korrelation zwischen Leptin_{res} und Fettmasse_{res} (r = 0,85, p < 0,0001 vor Therapie). Bei PWS zeigte nur HOMA-R_{res} eine Assoziation zu Fett- und Körpermasse_{res} (r = 0,5 jeweils), die aufgrund der kleinen Fallzahl nur einen Trend zur Signifikanz aufwies [172]. Die Magermasse war zu keinem Zeitpunkt mit den Androgenen korreliert.

Cortisol war nicht signifikant mit Parametern der Körperzusammensetzung oder den Hormonvariablen vor oder während der Behandlung assoziiert.

Tabelle 11: a) Regressionsmodelle bei Kindern mit PWS vor GH-Therapie

Abhängige Variable	1.erklär. Variable x ₁	Modell mit x ₁			2.erklär. Variable x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂				
		%R ²	p	n		%R ²	p	n	%R ²	p	p _{x1}	p _{x2}	n
DHEAS _{res}	Insulin _{res}	34	.017	16	IGF-I _{res}	5	n.s.	19	39	.042	.025	n.s.	16
DHEAS _{res}	Insulin _{res}	34	.017	16	BMI _{res}	0	n.s.	19	38	.045	.015	n.s.	16
DHEAS _{res}	HOMA-R _{res}	42	.017	13	Fat _{res}	0	n.s.	14	50	.043	.014	n.s.	12
DHEA _{res}	leptin _{res}	24	.046	17	IGF-I _{res}	33	.016	17	40	.029	.236	.077	17
DHEA _{res}	Insulin _{res}	22	(.065	17	IGF-I _{res}	33	.016	17	57	.004	.011	.006	17
)										
DHEA _{res}	HOMA-R _{res}	32	.045	13	IGF-I _{res}	33	.016	17	60	.011	.021	.025	13

x₁, x₂ = 1. und 2. In das Regressionsmodell eingebrachte erklärende oder unabhängige Variable, %R² = Quadrat des Pearsons Korrelations-Koeffizienten r_{Pea} in Prozent, gibt den Anteil der Variabilität der abhängigen Variablen an, der durch die 1. oder die 2. unabhängige Variable erklärt wird, oder durch beide gemeinsam; p = zugehörige Signifikanz im Fettdruck: *, **, *** =, p < 0.05, < 0.01, < 0.001; n.s. = nicht signifikant; p_{x1} = Signifikanz durch Einfügen der 1. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 2. schon enthalten war, p_{x2} = Signifikanz durch Einfügen der 2. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 1. schon enthalten war, n = Anzahl der für die Regressionsanalyse zur Verfügung stehenden Daten.

Tabelle 11: b) Regressionsmodelle bei Kindern mit PWS nach 12 Monaten GH-Therapie.

Abhängige Variable	1.erklär. Variable x ₁	Modell mit x ₁			2 nd Expl. Variab. x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂				
		%R ²	p	n		%R ²	p	n	%R ²	p	p _{x1}	p _{x2}	n
DHEA _{res}	leptin _{res}	67	.004	10	BMI _{res}	2	n.s.	19	74	.008	.004	n.s.	10
DHEA _{res}	leptin _{res}	67	.004	10	Insulin _{res}	0	n.s.	16	78	.011	.005	n.s.	9
AD _{res}	IGF-I _{res}	26	.036	17	BMI _{res}	0	n.s.	18	27	n.s.	.039	n.s.	17

Siehe Tabelle 11a) für Erläuterungen.

5 Ursachen und Folgen der Prämaturen Adrenarche (Publikation V [178], Publikation VI [182] und Publikation III [181])

5.1 Methoden

Diese retrospektive klinische Studie schloss Daten von 44 Kindern ein, die wegen prämaturer Pubarche zwischen 1980 und 1994 in der Universitäts-Kinderklinik vorgestellt wurden, 35 Mädchen und 9 Jungen, entsprechend einem Geschlechtsverhältnis von 3,9:1 (Tabelle 12) [183, 327, 328]. Bei den Mädchen trat die Schambehaarung im Median im Alter von 6,5 Jahren ein, zwischen 1,33 und 8 Jahren, bei den Jungen im Alter von 8,25 Jahren, zwischen 0,58 und 9 Jahren. 13 Mädchen und 3 Jungen wiesen eine Axillarbehaarung auf, 5 Mädchen eine leichte bis mittelschwere Klitorishypertrophie (0,5 – 1 cm) und 5 Mädchen eine Akne. Die Erstuntersuchung erfolgte bei manchen Kindern erst 1 Jahr nach der Manifestation, daher hatte bei 2 Mädchen auch bereits eine Brustentwicklung begonnen. Die Jungen hatten alle ein präpubertäres Hodenvolumen von höchstens 2 ml. Grösse, Gewicht, BMI, Pubertätsstadium und Störungen der Geschlechtsentwicklung wurden jeweils bei Studienbeginn (t_0), nach 1 Jahr (t_1), und nach mindestens 2 Jahren (t_2), im Median im Alter von 12,8 Jahren, bestimmt. Auxologische Parameter wurden als SDS der Zürcher Longitudinalstudie [268] angegeben. Bei Erstvorstellung wurde die Skelettreife nach Greulich und Pyle [113] ermittelt, und die Endgrössenprognose nach Bailey und Pinneau [28] errechnet. Bei allen Kindern wurde eine Sonographie der Nebenniere durchgeführt, mit der Tumoren ab ca. 2-3 cm Durchmesser erkannt werden können [270]. Zum Zeitpunkt t_2 konnte bei 12 Patienten (11 Mädchen und 1 Junge) die Endgrösse gemessen, und mit der initialen Prognose und der Elternzielgrösse verglichen werden. DHEAS, 17-OHP, Androstendion und Testosteron wurden direkt im Serum mit spezifischen Radioimmunoassays bestimmt, die anderweitig beschrieben sind [181, 182]. Um Enzymdefekte auszuschliessen wurde ein Synacthen (ACTH_{1-24}) - Kurztest (0,25 mg i.v.) durchgeführt, mit Bestimmung des 17-OHP bei 0 und nach 60 Minuten. Bei 11 Kindern mit PA wurde wegen besonders auffälliger Symptomatik (Wachstumsbeschleunigung, Klitorishypertrophie, „atypische PA“) oder DHEAS-Erhöhung über das Pubertätsstadium hinaus eine Säulenchromatographie mit anschliessendem RIA durchgeführt zur Bestimmung von basalem und ACTH-stimuliertem $\Delta 5$ -Pregnenolon (Preg) und 17-OH- $\Delta 5$ -Pregnenolon (17-OH-Preg) [297]. Hiermit sollte ggf. ein nicht-klassischer 3β -HSD-Mangel diagnostiziert werden, bei dem diese Vorstufen neben dem DHEAS massiv erhöht wären.

In dieser Studie bilden Patienten mit erhöhten Preg.- und 17-OH-Preg.- Spiegeln nach ACTH-Gabe eine Untergruppe, auch wenn die Werte unter dem Bereich für einen spätmanifesten 3β -HSD-Mangel lagen [327, 328]. Diese überschüssige NNR-Stimulierbarkeit wird im Folgenden als 3β -HSD-Insuffizienz oder "Exaggerated Adrenarche" bezeichnet, da sich die $\Delta 5$ -Vorstufen Pregneolon, 17-OH-Preg und DHEAS anstauen (s. Kapitel 1.6.1.). In einigen Abbildungen sind Patienten durch Punkte hervorgehoben, bei denen nach früheren Empfehlungen die biochemische Diagnose des nicht-klassischen 3β -HSD-Mangels in Betracht gezogen worden war, z.B. bei ACTH-stimulierten 17-OH-Preg.-Werten über 45,1 nmol/l bzw. 15 ng/ml, ca. 3-fach über der 95. Perzentile des Normbereiches [16]. Der nicht-klassische 3β -HSD-Mangel ist aufgrund der neueren molekulargenetischen Befunde unter einem Wert von 300 nmol/l praktisch auszuschliessen [214].

Tabelle 12: Klinische Merkmale von Kindern mit Prämaturer Pubarche geordnet nach Differentialdiagnosen und Untergruppen.

	Diagnose	Subgruppe	n	% von n=35 w bzw. n=9 m Patienten	Manifestations- Alter, m (Streubreite)	P 2	P 3	Crines axil- lares	Klitoris↑ / G >2	Akne
Mäd- chen n=35	PA	Alle w PA	31	88,6	6,5 (2,6 - 8,0)	27	4	13	2	2
		„normal“	13	37	6,25 (4,7 – 7,8)	12	1	8	1	1
		Adipös	4*	[11,4*]	8,0 (6,0 – 8,0)	4	-	-	-	-
		3β-HSD-Ins.	8	22,8	6,35 (2,6 – 8,0)	5	3	-	1	-
		21-OHD-Het.	9	25,7	6,75 (4,5 – 8,0)	9	-	2	-	1
	LO-21-OHD		2	5	5,7/ 7,3	1	1	2	1	1
	Tumor		2	5	1,3/ 4,0	-	2	-	2	2
Jun- gen n=9	PA	Alle m PA	7	78	8,7 (7,5 – 9,0)	7	-	1	-	-
		„normal“	3	33	8,8 (7,5 – 9,0)	3	-	-	-	-
		3β-HSD-Ins.	2°	22°	7,5/ 8,0°	2	-	-	-	-
		21-OHD-Het.	2	22	8,3/ 8,8	2	-	1	-	-
	LO-21-OHD		2	22	0,6/ 5,5	2	-	1	-	-

w = weiblich, m = männlich; PA = Prämatüre Adrenarche; 3β-HSD-Ins. = Insuffizienz der 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität; 21-OHD-Het.= Heterozygotie-Verdacht für 21-Hydroxylase-Mangel; LO-21-OHD = Late onset-AGS bei nicht-klassischem 21-Hydroxylasemangel. * 2 adipöse Mädchen haben auch erhöhte 17-OHP-Werte im ACTH-Test, 1 weiteres Mädchen ein erhöhtes 17-OHPreg., und sind auch in den Gruppen 21-OHD-Het bzw. 3β-HSD-Ins aufgeführt. ° 1 Junge ist gleichzeitig adipös (Prävalenz =14%).

Als Differentialdiagnose der Prämaturen Pubarche wurde die Diagnose eines nicht-klassischen 21-Hydroxylase-Mangels gestellt, wenn basal oder nach ACTH-Stimulation eine 17-OHP-Konzentration über 10 ng/ml (30 nmol/l) gefunden wird [239]; Diese Störung wird auch als spätmanifestes oder „late-onset“ AGS (LO-21-OHD) bezeichnet. Der Verdacht auf das Vorliegen einer Heterozygotie für einen 21-Hydroxylase-Mangel wurde bei stimulierten 17-OHP-Werten zwischen 3 und 10 ng/ml (10-30 nmol/l) geäußert, aber nicht weiter molekulargenetisch geprüft. Üblicherweise werden besondere klinische Zeichen bei Heterozygotie nicht erwartet, nun sollte aber geprüft werden, ob sich in einer weiteren Untergruppe der PA die sogenannten „manifesten“ 21-OH-Mangel-Heterozygoten von den anderen Kindern mit wirklich „idiopathischer PA“ unterscheiden.

In einer nachfolgenden Untersuchung von Kindern mit PA haben wir neben oben genannten Parametern freies Leptin [126] bestimmt, bei 30 Patienten, 21 Mädchen und 9 Jungen, die zwischen 1988 und 1995 in der Sprechstunde wegen idiopathischer PA (n= 16 Mädchen) und/oder Hirsutismus (n=5 weibliche Jugendliche) mit Anamnese einer PA betreut wurden [181]. Mit den gleichen Regressionsanalysen, wie in Kapitel 3.1. beschrieben, sollte in dieser Gruppe geprüft werden, ob auch bei PA ein Zusammenhang zwischen BMI und/oder Leptin und Androgenen besteht.

5.2 Ergebnisse der Hormonuntersuchungen und Diagnosestellung

Bei der Diagnostik der Prämaturren Pubarche gilt es zunächst, die symptomatischen Formen zu diagnostizieren.

Dies gelang durch Hormonuntersuchungen; der ACTH-Test und die molekulargenetische Diagnostik bestätigten Enzymdefekte, sowie die Bildung von NNR-Tumoren [183, 327, 328].

5.2.1 17-Hydroxy-Progesteron

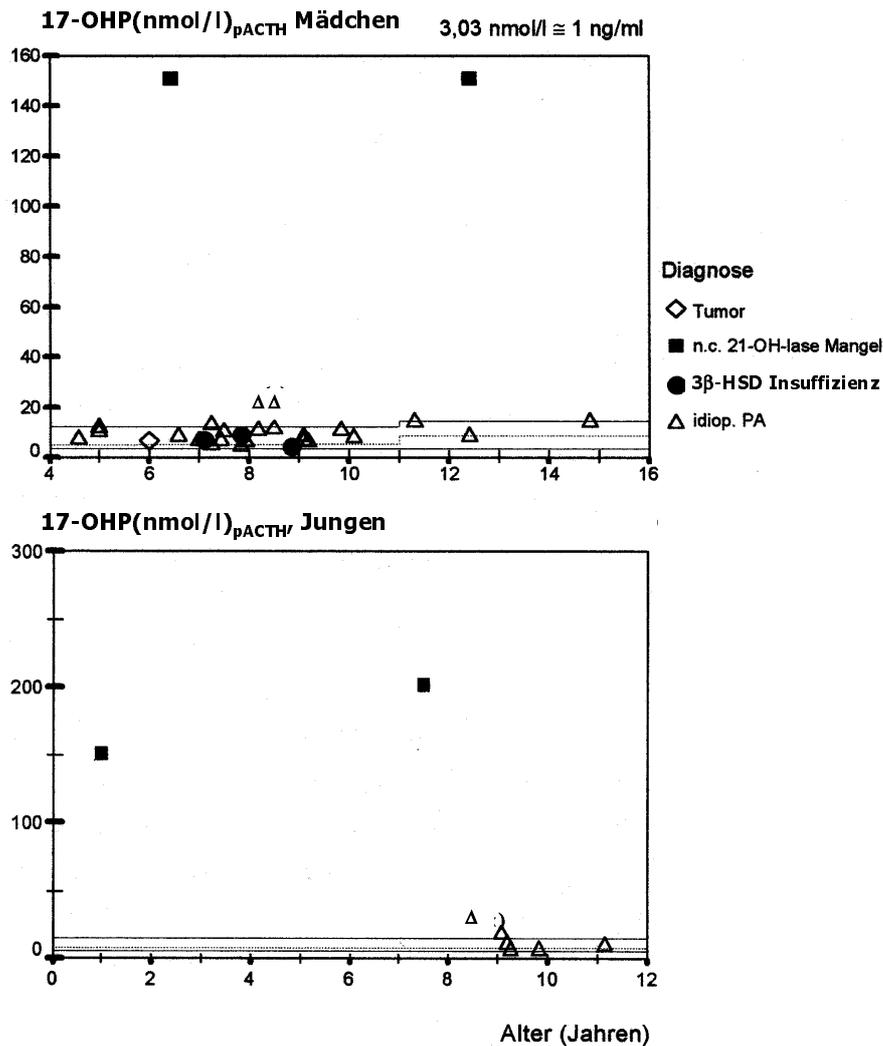


Abbildung 26: 17-OHP-Werte 60 min nach Stimulation mit 0,25 mg ACTH, Mädchen oben, Jungen unten. Die altersentsprechende obere Grenze des Normbereiches ist durch eine horizontale Linie angegeben, der Median durch eine gepunktete Linie. Kinder mit 3β-HSD-Insuffizienz sind mit einem Punkt besonders hervorgehoben.

Bereits die deutlich erhöhten Basalwerte des 17-OHP liessen klar erkennen, dass 2 von den Mädchen mit Prämaturer Pubarche, und 2 Jungen, Brüder, einen 21-Hydroxylase-Mangel haben (Tabelle 13). Dieser ist wie untenstehend (Kapitel 5.3.2.) ausgeführt nicht-klassisch und wurde molekulargenetisch gesichert. Der ACTH-Test brachte keine zusätzliche Information bei den Patienten mit nicht-klassischem 21-Hydroxylase-Mangel. Er diente aber dazu, 8 Mädchen und 2 Jungen mit leicht erhöhten stimulierten 17-OHP-Werten zwischen 10 und 30 nmol/l als mögliche Heterozygote für den 21-Hydroxylase-Mangel zu identifizieren (Abb. 26), wobei selbstverständlich die molekulargenetische Bestätigung der Heterozygotie in einer weiteren Untersuchung erfolgen sollte, die hier nicht geplant war. Diese Subgruppe machte 25,7 % aller Mädchen mit Prämaturer Pubarche und 22 % aller Jungen aus. In der europäischen Bevölkerung ist mit einer durchschnittlichen Heterozygotenfrequenz von 1:40 – 1: 60 zu rechnen, es wäre also mit nicht mehr als 2 % an erhöhten stimulierten Werten zu rechnen [162].

Tabelle 13: Basale Hormonwerte von Kindern mit Prämaturer Pubarche

	Diagnose	Subgruppe	n	Alter bei t ₀		17-OHP _{basal}		DHEAS		Testosteron	
				m	Streubr.	m	Streubreite	m	Streubreite	m	Streubreite
Mäd- chen n=35	PA	Alle w-PA	31	7,25	(4,6 – 9,3)	0,6	(0,1 – 1,92)	1500	(753 – 3334)	0,2	(0,13 – 0,67)
		„normal“	13	7,25	(5,2 – 8,8)	0,5	(0,1 – 1,2)	1500	(753 – 2769)	0,2	(0,13 – 0,35)
		Adipös	4	8,6	(7,3 – 9,3)	0,8	(0,58 – 1,92)	1645	(822 – 2261)	0,3	(0,2 – 0,67)
		3β-HSD-Ins.	8	7,1	(4,6 – 8,8)	0,6	(0,18 – 0,67)	1984	(834 – 2965)	0,2	(0,18 – 0,67)
		21-OHD-Het.	9	7,42	(5,0 – 9,3)	0,6	(0,3 – 1,2)	1043	(822 – 3334)	0,2	(0,13 – 0,38)
	LO-21-OHD		2	6,4/ 7,9		18,2/ 50,0		4912/ 2703		1,0/ 0,9	
	Tumor		2	1,8/ 5,7		5,9/ 6,3		>9999/ 3006		8,4/ 0,86	
Jun- gen n=9	PA	Alle m-PA	7	8,9	(8,1 – 9,7)	0,5	(0,38 – 0,95)	2029	(865 – 3126)	0,2	(0,2 – 0,26)
		„normal“	3	9,4	(9,2– 9,7)	0,6	(0,38 – 0,95)	2029	(865 – 3126)	0,2	(0,2 – 0,24)
		3β-HSD-Ins.°	2°	8,1/ 8,5°		0,42/ 0,48°		1448/ 2067°		0,2/ 0,2°	
		21-OHD-Het.	2	8,8/ 8,9		0,38/ 0,9		982/ 2315		0,2/ 0,28	
	LO-21-OHD		2	0,6/ 7,3		14,0/ 34,7		416/ 1955		0,2/ 0,71	

° 1 Junge ist gleichzeitig adipös. Weitere Erläuterungen s. Tabelle 12 und Text.

5.2.2 DHEAS

Bei Kindern mit Tumoren werden exzessiv hohe DHEAS-Werte gefunden, vgl. Abbildung 27, das Carcinom sezerniert typischerweise noch mehr als das Adenom. Die Höhe dieser Werte ist bei nicht-extraktiven Assays sicher auch durch die Kreuzreaktion anderer massiv erhöhter Steroidmedaboliten mit bedingt. Charakteristisch

für die PA ist die Erhöhung des DHEAS über die Altersnorm, wie auch hier bei allen Mädchen und 7 von 9 Jungen (Abbildung 27, Tabelle 13). Bei den Kindern mit noch im oberen Normbereich liegenden Androgen-Spiegeln wird eine erhöhte Empfindlichkeit angenommen [281].

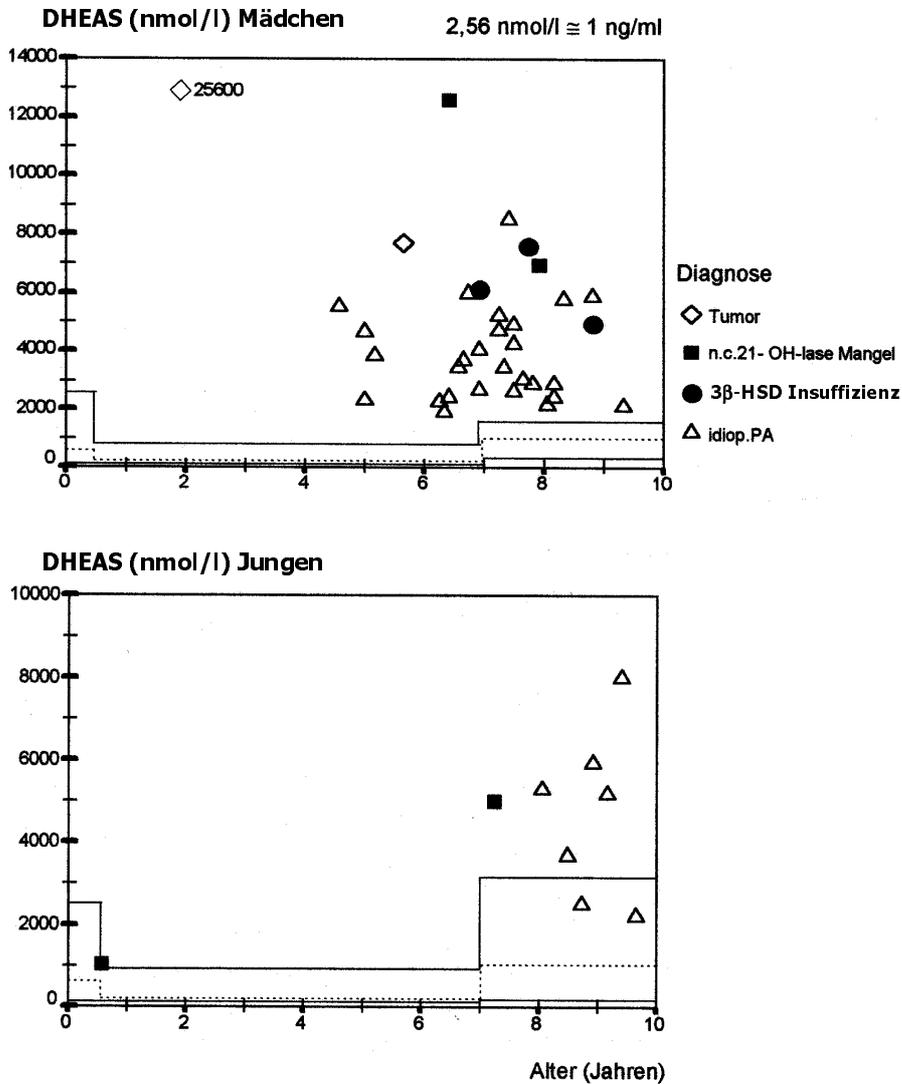


Abbildung 27: Basale DHEAS-Werte von Mädchen (oben) und Jungen (unten). S. Abb 26 für weitere Erläuterungen.

5.2.3 $\Delta 5$ -Pregnenolon (Preg) und 17-OH- $\Delta 5$ -Pregnenolon (17-OHPreg)

Bei 11 Kindern mit PA (9 Mädchen, 2 Jungen) wurden wegen ausgeprägter klinischer Symptomatik, oder deutlich zu hoher DHEAS-Spiegel weitere $\Delta 5$ -Steroide bestimmt. Preg war basal nur bei einem Mädchen erhöht, jedoch nach ACTH-Stimulation bei 4 Mädchen und den beiden Jungen (Abb. 28). 17-OHPreg hingegen war basal bei 4 Mädchen erhöht, und liess sich bei allen untersuchten Kindern mit Ausnahme eines Mädchens überschüssend stimulieren (Abb. 28). Diese Kinder wurden mittels intramuskulärer ACTH-Injektion erneut stimuliert und ein Steroid-Profil im Urin bestimmt. Hier zeigte sich nur bei den 3 Mädchen eine erhöhte $\Delta 5$ -Steroid-Ausscheidung, deren ACTH-stimulierte Serumwerte auch mehr als 6 SD erhöht waren (schwarze Punkte in Abb. 28). Bei allen

Kindern mit überschüssiger 17-OHPreg-Bildung, die als 3 β -HSD-Insuffizienz bezeichnet wurde, sollte im Folgenden geprüft werden, ob hier auch klinisch eine besondere Verlaufsform der PA besteht.

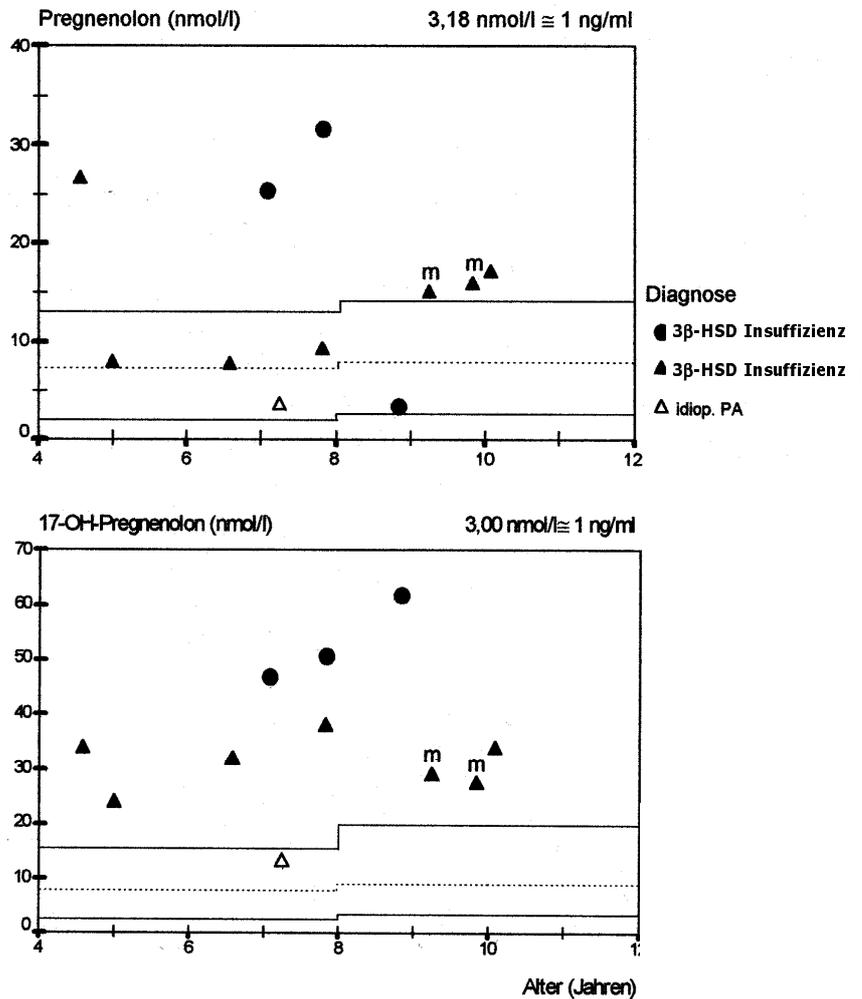


Abbildung 28: ACTH-stimulierte Pregnenolon- (oben) und 17-Hydroxy-Pregnenolon-Werte (unten). m = männlich. S. Text und Abb. 26 für weitere Erläuterungen.

Grundsätzlich waren die 17-hydroxylierten Steroidwerte meist stärker stimuliert als die nicht-hydroxylierten, so dass daraus eine besondere Ansprechbarkeit der 17-Hydroxylase auf ACTH abgeleitet werden kann. Dazu passt, dass 2 Mädchen mit Verdacht auf 3 β -HSD-Insuffizienz auch leicht erhöhte 17-OHP-Werte hatten (3,2 und 3,4 ng/ml). Diese Beobachtung wurde von anderen Autoren bei einigen Patienten mit PA gemacht und die Kombination von niedriger 3 β -HSD-Aktivität und überschüssiger 17-Hydroxylase-Stimulation als „Exaggerated Adrenarche“ bezeichnet ([213, 282] vgl. Einleitung 1.6.1.).

5.2.4 Testosteron

Ein erhöhtes Testosteron fand sich bei den Patienten mit NNR-Tumoren, und mit 21-Hydroxylase-Mangel, sowie bei einer extrem adipösen Patientin mit Verdacht auf 3 β -HSD-Insuffizienz (Tabelle 13). Bei hohen Testosteron-Spiegel ist eine deutliche Androgenisierung zu erwarten. Sie dienen grundsätzlich als Hinweis auf das Vorliegen einer symptomatischen PA. Testosteron ist bei prämaturer Adrenarche zur speziellen Differentialdiagnostik jedoch nicht geeignet.

Tabelle 14: Longitudinale auxologische Parameter von Kindern mit Prämaturer Pubarche, Mediane (Streuung)

Diagnose	Subgruppe	Erstvorstellung				PA-Kontrolle nach 1 Jahr									
		n	v-SDS _{CA} m	SA/CA m	Streuung Streuung	Prog. Endgrösse -Elternzielgr.[cm]	n	v-SDS _{CA} m	SA/CA m	Streuung Streuung	Prog. Endgrösse -Elternzielgr.[cm]				
Mädchen n=35	Alle w-PA „normal“ Adipös 3β-HSD-Ins. 21-OHD-Het.	31	0,25	(-4,9 – 3,9)	1,18	(1,0 – 1,53)	-3,0	(-19,0 – 9,5)	31	0,59	(-2,8 – 2,7)	1,16	(0,98 – 1,38)	-5,5	(-20,5 – 11,0)
		14	-0,37	(-1,3 – 1,62)	1,14	(1,03 – 1,45)	-3,0	(-12,0 – 9,5)	14	0,47	(-0,8 – 2,45)	1,16	(1,0 – 1,37)	-3,0	(-10,0 – 7,5)
		4	1,08	(0,97 – 1,72)	1,26	(1,02 – 1,53)	-5,0	(-11,0 – 4,5)	3	-0,4	(-0,93 – 0,7)	1,1	(0,98 – 1,22)	0,5	(-8,0 – 3,5)
		8	1,36	(-4,9 – 2,88)	1,18	(1,0 – 1,53)	3,5 ^a	(-6,0 – 8,0)	8	-0,31	(-2,8 – 2,19)	1,16	(1,11 – 1,31)	0,0 ^a	(-13,0 – 11,0)
		9	-0,37	(-1,3 – 3,94)	1,24	(1,01 – 1,43)	-9,8 ^a	(-19,0 – 4,5)	8	0,93	(-1,19 – 2,7)	1,19	(0,98 – 1,38)	-8,8 ^a	(-20,5 – 3,5)
O-21-OHD		2	4,51/ -2,85		1,64/ 1,21	-14/ -									
Tumor		2	-0,2/ 2,0		1,71/ 1,37	- / -5,5									
Jungen n=9	Alle m-PA 3β-HSD-Ins. ^o 21-OHD-Het.	7	1,06	(-1,59 – 2,51)	1,06	(0,83 – 1,23)	3,0	(-8,0 – 17,5)	5	1,74	(-0,85 – 4,2)	1,22	(1,06 – 1,3)	6,0	(-10,0 – 12,5)
		2 ^o	1,08/ 1,06 ^o		0,94/ 1,08 ^o	3,0/ 6,0 ^o	2 ^o	/ 1,24 ^o					- / 1,24 ^o	- / 6,0 ^o	
		2	1,14/ 0,06		1,14/ 1,23	-8,0/ 1,0	2	1,74/ -0,85					1,22/ 1,3	-2,0/ -10,0	
O-21-OHD		2	0,85/ -1,37		2,59/ 1,17	- / -11,0									

v-SDS_{CA} = Wachstumsgeschwindigkeit in SDS, bezogen auf chronologisches Alter; **SA/CA** = Quotient aus Skeletalter / Chronologisches Alter; **Prog. Endgrösse –Elternzielgr.[cm]** = Differenz zwischen Endgrösseprognose nach Bailey&Pinneau und Eltern-Zielgrösse in cm; **n** = Anzahl der untersuchten Kinder; ^a Signifikanter Unterschied zwischen den gleich bezeichneten Gruppen in derselben Spalte, p < 0,01. ^o 1 Junge ist gleichzeitig adipös. Weitere Erläuterungen s. Tabelle 12.

5.2.5 Androstendion

Bei 13 von 31 Mädchen und 5 von 9 Jungen mit PA konnte Androstendion bestimmt werden, basal und nach ACTH-Stimulation, und war durchweg erhöht (Daten nicht gezeigt). Da es nicht in der Gruppe der Kinder mit Verdacht auf Heterozygotie des 21-OHD gemessen wurde, konnte es für den Nutzen in der Differentialdiagnostik nicht bewertet werden. Gleichwohl fiel auf, dass zwei 7- bzw 8 jährige Mädchen mit Adipositas recht hohe Androstendion-Werte boten, 4,1 bzw. 5.36 nmol/l, die durch ACTH nicht weiter stimulierbar waren, und auf eine ovarielle oder periphere Herkunft weisen können, während sie bei den Mädchen in der Gruppe der 3 β HSD-Ins. gut stimulierbar waren und auf den adrenalen Ursprung deuten.

5.3 Differentialdiagnosen der Prämaturen Pubarche

5.3.1 NNR-Tumoren

Nebennierenkarzinome sind die wichtigste, wenn auch extrem seltene Differentialdiagnose der Prämaturen Pubarche. Sie manifestieren sich meist wie hier besonders früh, vor dem Alter von 4 Jahren, und mit deutlicher Virilisierung, wie hier Klitorishypertrophie und Akne (Tabelle 12) [183, 327, 328] als atypische PA. In der Gruppe der Mädchen mit Prämaturer Pubarche lag die Tumorinzidenz bei 5%. Die Neigung der NNR-Tumoren zum weiblichen Geschlecht ist mit 5:1 bei Kleinkindern dokumentiert [209]. Die Skelettreifung kann aufgrund der Androgenwirkung beschleunigt sein, wie hier (Tabelle 14). Dies ist jedoch nur der Fall, wenn die Cortisol-Sekretion nicht oder nur mässig erhöht ist, da Glucocorticoide die Skelettreife verzögern (wie bei dieser Patientin: Cortisol basal 11.5 μ g/dl, um 20 Uhr 11,7 μ g/dl, erhöht). Die Tumoren wurden mittels Sonografie gefunden, da beide über 2 cm gross waren, und im Kernspintomogramm bestätigt. Beim jüngeren Mädchen wurde der ca. 8 cm grosse Tumor in toto entfernt, und allein die Grösse spricht beim NNR-Tumor für Malignität. Der Histologie-Befund und diverse Marker bestätigten die Diagnose, und, da keine Metastasen vorhanden waren, entsprach er dem Stadium 2. Dieses hat nach kompletter Tumorresektion eine gute Prognose [277]. Die vorzeitige Schambehaarung des älteren Mädchens war durch ein knapp 3 cm grosses NNR-Adenom bedingt. In beiden Fällen zeigten normale NNR-Androgen-Spiegel im postoperativen Verlauf die anhaltende Remission beider Tumoren an. Die postoperativen Kontrollen des Mädchens mit Carcinom bis zum 14. Lebensjahr zeigten, dass die Pubertät und das Wachstum normal im Rahmen der genetisch zu erwartenden Variabilität verliefen.

5.3.2 21-Hydroxylase-Mangel (Publikationen V [178, 182] und VI [178, 182])

Die untersuchten Kinder boten das gesamte Spektrum der Manifestationen des nicht-klassischen 21-OH-Mangels: dieser ist ein sich nach der Geburt (Patient G.G.) bis zum Erwachsenenalter manifestierendes AGS, welches im Kindesalter mit Symptomen wie Prämatüre Pubarche (Patient G.S.) oder Klitorishypertrophie einhergeht (Patientin K.G.), oder im Erwachsenenalter mit Hirsutismus, Zyklusstörungen, wie bei der Patientin R.A., oder Infertilität. Nicht unbedingt manifestieren sich die Gendefekte früher als die idiopathischen Formen der PA (Patientin R.A.). Klinisch hinweisend kann auch die Skelettreifungsbeschleunigung mit einem Voranschreiten von über 2 Jahren sein (SA/CA>1,3, Tabelle 14). Bei den hier beobachteten Patienten fiel klinisch auf, dass ihre Wachstumsgeschwindigkeit zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht unbedingt erhöht war, dass aber die Skelettreife in allen Fällen deutlich vorangeschritten war. Daraus entstand eine zum Teil deutliche Einschränkung der Endgrössenprognose. Diese konnte bei einem Säugling und einem Mädchen ohne bekannte Elterngrösse nicht bestimmt werden (Tabelle 14). Den klinischen Auffälligkeiten entsprechend lag der

Testosteron-Spiegel jenseits des Säuglingsalter bei den hier untersuchten nicht-klassischen AGS- Patienten oberhalb des Bereiches der Kinder mit idiopathischer PA. 17-OHP kann im Neugeborenen-Screening noch unter der Grenze liegen, die für die Diagnose eines klassischen AGS herangezogen wird (G:G: und G:S., Tabelle 15), und der Enzymdefekt zeigt sich erst später.

Tabelle 15: Daten der 4 Patienten mit nicht-klassischem AGS bei 21-Hydroxylase-Mangel (LO-21-OHD) [178].

ID	w/m	Symptome	Man. Alter (J.)	17-OHP basal →ACTH-stim. (ng/ml)	17-OHP Screen (ng/ml)	Ethnische Abstammung	Matern. Mutation	Paternale Mutation	AGS- Typ
R,A	w	PA; Primäre Amenorrhoe	8,0	70.0 → 82.0	n.b.	Serben	P30L	P30L	NC
K,G	w	PA; Klitorishypertrophie	6,4	18.2 → 81.0	14	Deutsche	G178R*	Intron 2, A/C655G	?/ Viril.- Salzverl.
G,S	m	PA	7,2	36.4 → 57.8	6	Türken	P453S	P453S	NC
G,G	m	PA	0,6	14.5 → >50.0	5	„	P453S	P453S	NC

Man. = Manifestation, 17-OHP-Screen. = 17-OHP-Bestimmung im Filterpapier am 5. Lebenstag.

* neue Mutation, funktionelle Charakterisierung noch ausstehend.

Grundsätzlich stimmen die Schweregrade des AGS – mit oder ohne Salzverlust bis hin zum LO-AGS, gut mit dem Phänotyp überein [178, 182]. Daher ist das nicht-klassische AGS meist bedingt durch Punktmutationen. Ein Southern-Blot zum Erfassen von Deletionen und Konversionen, und auch ein Screening auf bekannte Mutationen, wie hier bei der Patientin R.A., mittels Allel-spezifischer Oligonucleotid-Hybridisierung [304] reichte bei diesen leichten Formen nicht aus, um bei allen Patienten die 21-OH-Defekte zu finden. Es mussten Sequenzierungen durchgeführt werden, um die Defekte bei den Patienten G.G. und G.S. sowie [178] die noch nicht beschriebene Mutation bei der Patientin K.G. zu finden, und letztere musste noch funktionell charakterisiert werden (Daten nicht gezeigt).

5.4 Charakterisierung der Subgruppen der PA

5.4.1 Klinische und biochemische Besonderheiten bei Manifestation

Das Alter bei Manifestation einer PA scheint bei Verdacht auf 3-β-HSD-Insuffizienz etwas niedriger zu liegen, als bei den übrigen Formen, und bei den Adipösen etwas höher (Tabelle 12). Diese Unterschiede waren jedoch aufgrund der kleinen Gruppen nicht signifikant. Vorangeschrittene Scham- oder Axillarbehaarung, Akne oder Klitorishypertrophie traten nicht gehäuft in einer bestimmten Subgruppe auf. Die Hormonwerte (Tabelle 13) zeigten lediglich einen signifikant höheren DHEAS-

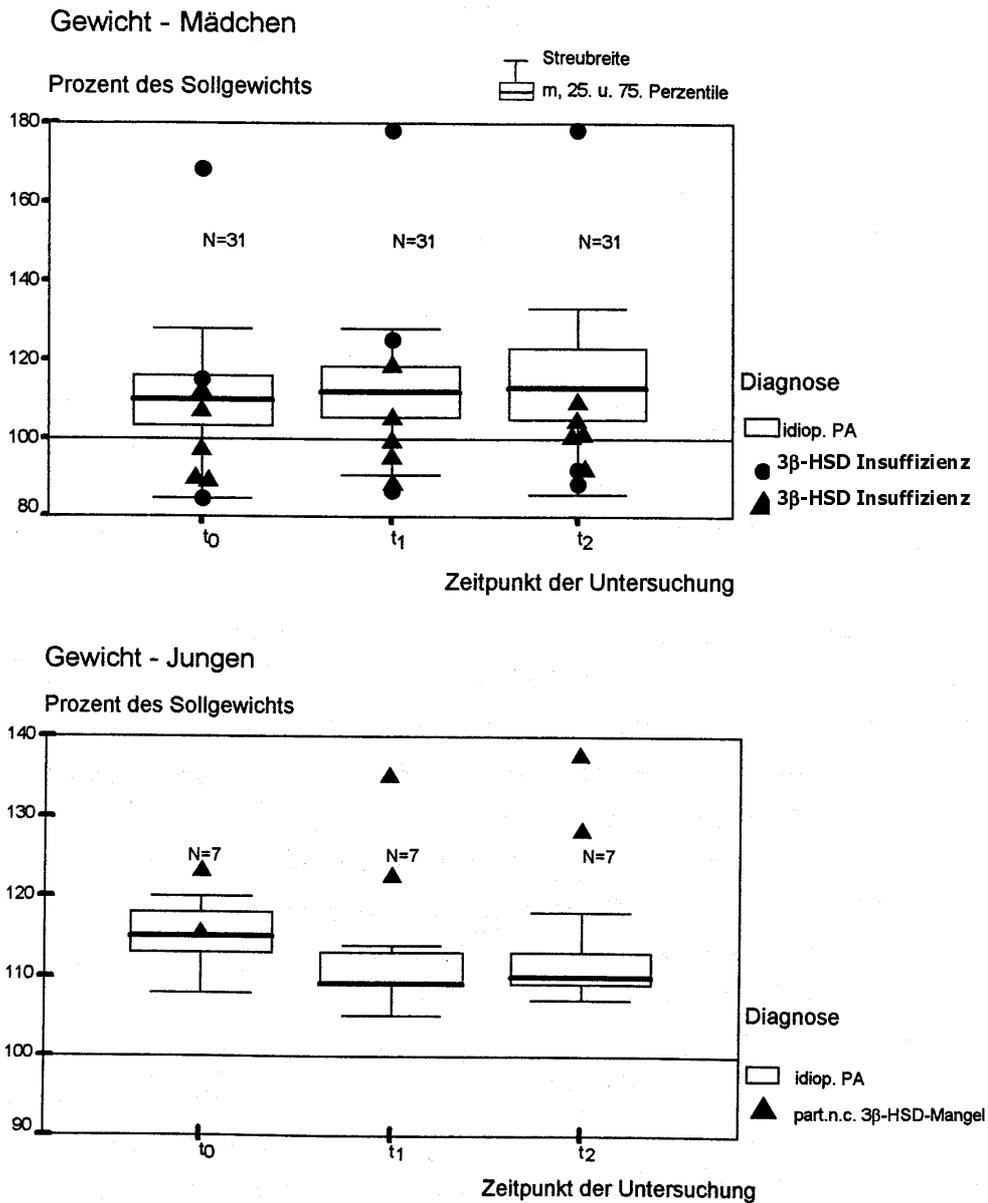


Abbildung 29:

Relativgewicht (in % vom Längen-Sollgewicht) bei Erstuntersuchung, nach einem Jahr und bei der Nachuntersuchung der Gesamtgruppe der „idiopathischen“ PA, Mädchen (oben) und Jungen (unten). Einzelne Patienten aus den Subgruppen sind besonders hervorgehoben.

Medianwert in der Gruppe der 3β-HSD-Insuffizienz im Vergleich zu dem der 21-OHD-Heterozygoten. Dieser Trend passt zu den vermuteten Abweichungen der Enzymaktivitäten, hohe DHEAS-Spiegel sind für den 3β-HSD-Mangel [214], und niedrige für den 21-Hydroxylase-Mangel beschrieben worden [334].

5.4.2 Verlauf der auxologischen Parameter

Zur Erstuntersuchung (Altersmedian $t_0=7,2$ Jahre) lag das Relativgewicht (Abb. 29) bei Mädchen (Median=109%) wie Jungen (Median=115%) im oberen Normbereich, aber eigentlich adipös (Relativgewicht >120%) waren nur 4 Mädchen und 1 Junge (Anteil an der gesamten PA-Gruppe 11,4 bzw. 14%). Bei der Nachuntersuchung (Altersmedian $t_2=12,8$ Jahre) befand sich das durchschnittliche Relativgewicht der Mädchen noch bei 110% und der Jungen bei 118%.

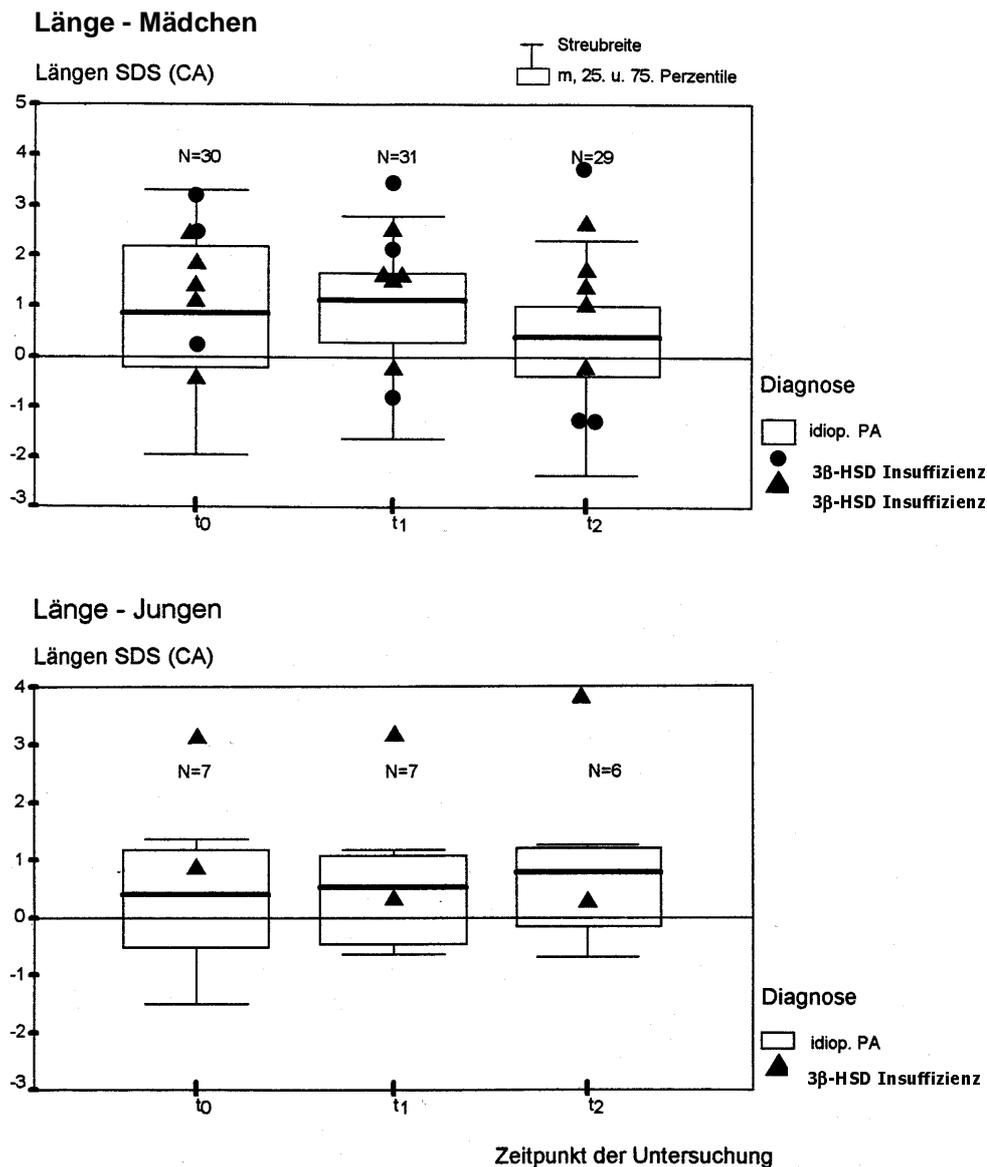


Abbildung 30:

Längen-SDS, bezogen auf das chronologische Alter, bei Erstuntersuchung, nach einem Jahr und bei der Nachuntersuchung der Gesamtgruppe der „idiopathischen“ PA, Mädchen (oben) und Jungen (unten). Einzelne Patienten aus den Subgruppen sind besonders hervorgehoben.

Die Abbildung 30 zeigt, dass die Länge der Mädchen (Median=1,23 SD) mehr noch als die der Jungen (Median =0,8 SD) mit PA im oberen Normbereich liegt. Der Längen-SDS nahm nur bei den Mädchen im Verlauf der Beobachtung leicht ab. Die durchschnittliche Wachstumsgeschwindigkeit lag in der Gesamt-PA-Gruppe der Mädchen im mittleren Normbereich bezogen auf das chronologische Alter, bei den Jungen im oberen (Tabelle 14), und war bei beiden Geschlechtern auch normal bezogen auf die Skelettreife (Median t_0 : 0,5 bzw. 0,35 SD). Nach 1 Jahr, im Alter von 8,4 Jahren, blieb die Wachstumsgeschwindigkeit der Mädchen weitgehend konstant, und ebenso war ihre Skelettreifungsbeschleunigung, erfasst als Quotient aus Skeletalter geteilt durch chronologisches Alter, nicht progredient (Tabelle 14). Dadurch blieb die Endgrößenprognose der Mädchen unverändert unter der Elternzielgrösse, aber im Bereich der normalen Streubreite. Bei den Jungen nahm die Wachstumsgeschwindigkeit, bezogen auf das Chronologische Alter, im 1. Beobachtungsjahr tendenziell zu (Tabelle 14), da bei 2 Patienten eine gonadale Entwicklung und der Pubertätswachstumsschub einsetzten. Die initiale Endgrößenprognose lag leicht über der Elternzielgrösse, und bei den Jungen war erst im Verlauf der Beobachtung eine Akzeleration der Skelettreifung festzustellen. Die Diskrepanzen zwischen Jungen und Mädchen lassen sich wie folgt erklären: Die Jungen waren bei Manifestation und mehr noch bei der Erstuntersuchung schon nahe dem Alter der physiologischen Pubarche, haben also eine geringere Reifungsbeschleunigung, und daher sind Wachstums- und Skelettreifungsakzeleration bei ihnen noch zu beobachten, während sie bei den Mädchen schon abgelaufen sind. Für alle beschriebenen Veränderungen liessen sich aufgrund der kleinen Fallzahlen keine Signifikanzen feststellen.

In der Gruppe der Mädchen mit Verdacht auf 21-OHD-Heterozygotie zeichneten sich ähnliche Besonderheiten ab, wie beim LO-21-OHD: die Wachstumsgeschwindigkeit (Mediane) war normal, die Skelettreife deutlicher als in der Gruppe mit 3- β -HSD-Insuffizienz akzeleriert, und daraus ergab sich eine signifikant schlechtere initiale Endgrößenprognose als bei Kindern mit Verdacht auf 3- β -HSD-Insuffizienz (Tabelle 14). Die 21-OHD-heterozygoten Mädchen fielen jedoch nicht besonders aus der Gesamtgruppe heraus. Im 1. Beobachtungsjahr verbesserte sich die Wachstumsgeschwindigkeit in der Gruppe der 21-OHD-Heterozygoten, während sich in der Gruppe 3- β -HSD-Insuffizienz ein Trend zur Verschlechterung zeigte (Tabelle 14). Interessanterweise fanden sich die schlechtesten Endgrößenprognosen auch bei den Jungen mit Verdacht auf 21-OHD-Heterozygotie.

Anlässlich der Nachuntersuchung konnte von 12 ehemaligen Patienten die Erwachsenengrösse bestimmt werden, 1 Junge und 11 Mädchen, von denen eines mit Cyproteron-Actetat (CPA) wegen einer drastischen Verschlechterung der Endgrößenprognose behandelt worden war. Die Daten dieser beiden Patienten sind in Abb. 31 hervorgehoben, jedoch nicht im Median enthalten. Der Median der Erwachsenengrösse der Mädchen betrug 165 cm (0,06 SD, von -2,55 bis 2,37), und lag im Median über der Elternzielgrösse von 160,5 cm (-0,7 SD, von -1,62 bis 2,35). Die Erwachsenengrösse hatte sich bei allen Mädchen nicht verschlechtert gegenüber der initialen Prognose (157,5 cm, -1,2 SD, Streubreite -2,98 bis 0,4 SD), ausser bei dem Jungen, der unter Beobachtung eine deutliche Verschlechterung der Prognose erfuhr, letztlich aber doch mit 175 cm (-0,44 SD) eine normale Grösse erreichte, und 5 cm unter der initialen Prognose bzw. 4 cm unter der Elternzielgrösse sein Wachstum abschloss. Die Abbildung 31 zeigt, dass die Endgrößenprognose der 4 Patienten mit 21-OHD-Heterozygotie sich nicht von den anderen unterschied, und in 2 Fällen unter der EZG (-6,5 cm, Patientin mit CPA, und -10 cm) sowie in 2 Fällen über der EZG (3 bzw. 4 cm) lag. Die eine Patientin mit 3- β -HSD-Insuffizienz wies eine Endgrösse im Bereich der EZG auf. Hinsichtlich der Endgrösse hat die PA offensichtlich einen günstigen Spontanverlauf.

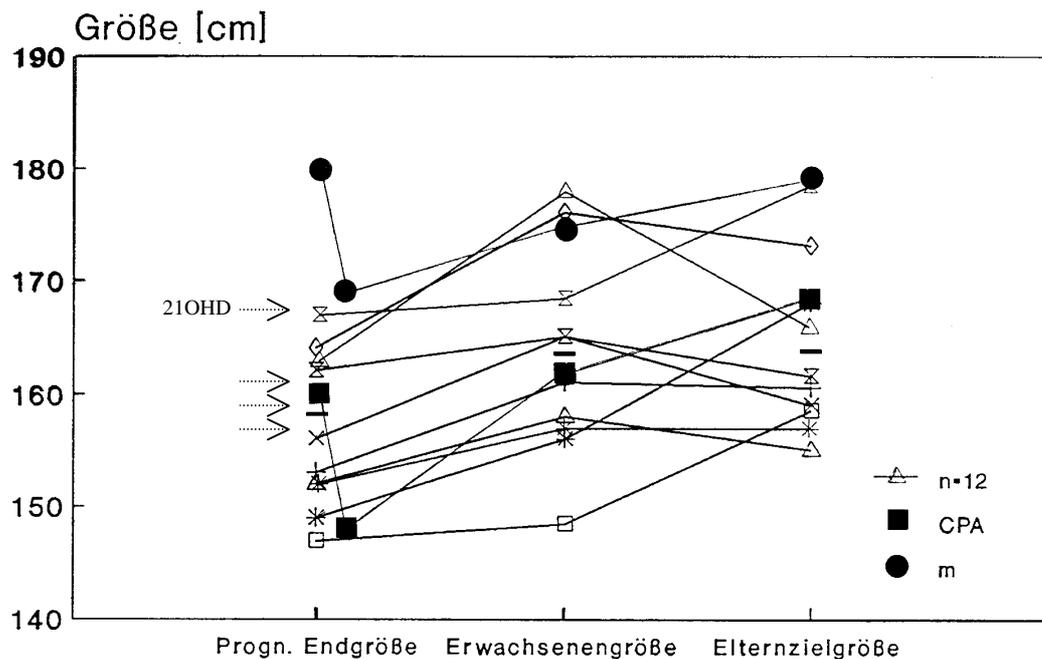


Abbildung 31: Individueller Vergleich der Grössenprognose bei Erstuntersuchung mit der Erwachsenengrösse und der Elternzielgrösse bei 12 Kindern mit PA.
 — = Median (ohne Einrechnung des Jungen = m und des behandelten Mädchens = CPA, Cyproteron-Actetat). Markierung mit → = 21-OHD-Het.; * = 3βHSD-Ins.

5.5 Nachuntersuchung der Mädchen mit PA – Unterschiede zwischen den Subgruppen?

Von den 31 Mädchen konnten 27 nach $5,5 \pm 4$ Jahren bei einem Altersmedian von 13 Jahren nachuntersucht werden [183, 327, 328]. Drei Mädchen aus der Gruppe der idiopathischen PA und eines aus der 21-OHD-Het-Gruppe wollten nicht mehr untersucht werden. Von den 27 Mädchen litten 7 unter Akne, wobei diese Zahl im Vergleich zur Prävalenz von 90% bei britischen Adolescentinnen im Alter von 18 Jahren nicht sehr hoch erscheint [55].

Insgesamt fällt auf, dass die Menarche bereits bei 17 Mädchen eingetreten war, obwohl dies vom Menarchealter der Mutter her nur bei 12 zu erwarten gewesen wäre. In der Gesamtgruppe trat die Menarche bei PA um 1 Jahr früher als vom mütterlichen Menarchealter erwartet ein ($p < 0.01$). Allerdings unterschied sich das Menarchealter in der Gruppe der 21-OHD-Het. nicht signifikant von dem der Mütter (-0,38 Jahre). Auch gegenüber dem in Deutschland zu erwartenden Menarchealter von 13 Jahren [57, 129, 254] war der Eintritt der Menarche in allen Gruppen der Mädchen mit PA verfrüht.

Eine Zyklusunregelmässigkeit wiesen insgesamt 5 von 17 postmenarchalen Mädchen (29%) im mittleren Alter von 14,5 Jahren auf. Allerdings ist erst 3 Jahre nach Menarche mit einer Zyklusstabilisierung [6] zu rechnen, so dass von einer echten Zyklusstörung bei 3 von 10 in Frage kommenden Mädchen vorlag (30%). Von diesen wiederum waren 2 Mädchen zugleich adipös. Hieraus könnte gefolgert werden, dass neben der peripubertären Hyperandrogenämie gleichfalls die Adipositas ein wesentlicher Risikofaktor für die ovarielle Dysfunktion ist, wie auch anderweitig beschrieben, soweit sie mit einer Hyperinsulinämie einhergeht [71, 72]. Anzahl und Alter der Patientinnen dieser Nachuntersuchung sind zu gering für eine zuverlässige Aussage zu sekundären Störungen der Ovarfunktion.

Fünf Mädchen zeigten eine auffällige Körperbehaarung, von diesen hatte eine, die 16,1-Jährige Patientin aus der 3 β -HSD-Insuffizienz-Gruppe, zugleich eine Zyklusstörung, und war sehr adipös (BMI 35 kg/m²). Der Anteil der hirsuten Mädchen lag in der Gesamtgruppe (29%) über der normalen Hirsutismus-Prävalenz von ca. 7% bei spanischen bzw. amerikanischen Frauen [12, 161].

Tabelle 16: Klinische Symptome bei 27 nach 5,5 \pm 4 Jahren untersuchten Mädchen mit PA

Mediane (Spannbreite)		n	Akne	Men. n/Soll	Men- Alter Mutter	Men- Alter ^o Pat.	Alter ^o v. Pat. mit Zyklus	Zyklus ^o -störung	Hir- sut. ^o
Gesamt-PA	27	13 (5,8 - 20,8)	7 [26%]	17/12	13,0 (10,0 – 17,0)	12,0 (9,5 – 13,5)	14,5 (10,8 - 20,8)	5 [29%]	5 [29%]
Subgruppen: „normal“	10	13,9 (8,4 – 20,8)	3	8/6	13,0 (11,0 – 17,0)	11,8 (10,3 – 13,5)	14,6 (12,7 – 20,8)	2	2
Adipös	4*	14,3 (11,8 – 16,1)	1	3/2	12,5 (12,0 – 13,0)	11,0 (9,5 – 12,0)	16,1/15,1	2*	1*
3 β -HSD-Ins.	8*	10,2 (5,8 – 16,1)	1	2/0	12,5/ 16,0	9,5/ 10,8	16,1/ 10,8	1*	2*
21-OHD-Het.	8*	13,9 (8,8 – 20,8)	2	6/6	13,0 (12,0 – 13,0)	12,5 (11,0 – 13,0)	15,0 (13,0 – 20,8)	1	1

* = 2 adipöse Mädchen hatten auch erhöhte 17-OHP-Werte im ACTH-Test, und 1 weiteres Mädchen ein erhöhtes 17-OHPreg., und sind auch in den Gruppen 21-OHD-Het bzw. 3 β -HSD-Ins aufgeführt.. Men. = Menarche; ^o = Nur bei 12 der 27 nachuntersuchten Mädchen war seitens des mütterlichen Menarchealters eine Menarche zu erwarten, aber schon bei 17 eingetreten. Alle mit ^o bezeichneten Angaben und [der relative Anteil an Symptomträgerinnen] beziehen sich auf diese 17 postmenarchalen Mädchen.

Keine der Störungen trat in einer der Subgruppen deutlich gehäuft auf, jedoch war die Zahl der Beobachtungen recht niedrig. Für die prospektive Erkennung, welches Mädchen eine postmenarchale Störung entwickeln wird, gab es keine Charakteristika. Weder das Menarchealter, noch die Androgenspiegel bei Manifestation unterschieden sich bei den 8 Mädchen mit Zyklusstörungen und/oder Hirsutismus vom Rest der Gruppe

5.6 Einfluss von Adipositas und Leptin bei PA (Publikation III [181])

Zur Frage, ob die PA durch eine Adipositas beeinflusst wird, oder durch Leptin, oder durch beide Faktoren, wurde ein Gruppe von 30 Kindern im Alter von 9 Jahren, 21 Mädchen und 9 Jungen mit einer Anamnese einer PA untersucht (Tabelle17) [181].

Tabelle 17: Daten der Patienten mit Prämaturer Adrenarche (PA) oder Hirsutismus nach PA und einer passenden Kontrollgruppe¹, Mediane (Streubreite)

	PA und Hirsutismus ¹	Kontrollgruppe ¹	Referenzwerte
Gesamtzahl (Mädchen)	30 (21)	30 (21)	-
Chronologisches Alter	9.1 (5.0 – 17.1)	9.3 (5.1 – 15.0)	8-10
Skeletalter	10.5 (5.0 – 18.0)	10.0 (5.0 – 15.0)	-
P Stadium	3 ^{**} (2 – 6)	1 (1 – 5)	-
B oder G Stadium	1 (1 – 5)	1 (1 – 5)	-
Grössen-SDS	0.7 (-2.1 – 5.2)	1.1 (-1.9 – 4.4)	-
Relativgewicht [%]	114 (71 – 181)	104 (78 – 124)	-
BMI-SDS	1.5 (-2.9 – 8.1)	1.8 (-1.0 – 7.2)	-
Leptin [pmol/l]	48 (12 – 733)	54 (12 – 431)	19,5 (10 – 92)
DHEAS [µmol/l]	6,18 ^{**} (0,59 – 14,6)	3,08 (0,29 – 9,50)	0,62 (0,21 – 3,4)
n =	29	29	
AD [nmol/l]	4,05 [#] (1,05 – 14,7)	2,06 (0,17 – 6,35)	0,98 (0,17 – 2,6)
n =	16	19	

¹13/30 Kinder mit Brust- oder Genital-Stadium >2, und Kontrollen passend gewählt für Geschlecht, BMI und Knochenalter. P, B, G= Tanner –Stadien für Schambehaarung, Brust- oder Genital-Entwicklung. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 signifikanter Unterschied versus Kontrollgruppe im Student's t-Test. # p<0.05 signifikanter Unterschied versus Kontrollgruppe im nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test

Die 9 Jungen wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung einen Altersmedian von 9,9 Jahren auf, von 7,7 bis 12,6 Jahren, und 6 von ihnen wiesen ein Relativgewicht über 120% auf, d.h. 66% waren übergewichtig. Von den 8 Mädchen ohne Brustentwicklung (Alter 7,7 Jahre, Streubreite 5 – 10 Jahre) war nur eines adipös (12,5%), während von den 13 pubertären Mädchen im Alter von 10,9 Jahren (Streubreite 6,9 – 17,1 Jahre) 5 adipös waren (39%). Dementsprechend lag das mediane Relativgewicht recht hoch mit 114%, ebenso wie der BMI (1,5 SD, Tabelle 17). Um für die Effekte der Adipositas zu kontrollieren, wurde die Vergleichsgruppe für Geschlecht, Alter und BMI passend gewählt. Von den klinischen Parametern lag nur das Stadium der Schambehaarung in der PA-Gruppe signifikant höher. Die Leptin-Spiegel streuten dem Gewicht entsprechend und befanden sich im oberen Normbereich. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen, was darauf hinweist, dass Leptin mit der PA nicht klar zusammenhängt. DHEAS und Androstendion waren in der PA-Gruppe signifikant erhöht. Nun wurde der Zusammenhang zwischen Körpermasse und Androgenspiegeln geprüft, mittels multipler Regressionsanalyse. Die Kovariaten BMI und Leptin waren in der PA-Gruppe ebenso gut wie bei den Vergleichskindern korreliert ($r=0,71$, $p<0,001$). Zwischen den alterskorrigierten Residuen $DHEAS_{res}$ oder $Androstendion_{res}$ und BMI-SDS, Leptin_{res} oder Grössen-SDS waren keine Zusammenhänge zu finden, einzeln oder in verschiedenen Kombinationen. Lediglich fand sich eine Korrelation zwischen $DHEAS_{res}$ und Grössen-SDS ($r=0,42$, $p<0,05$), offenbar als Folge der Steigerung des Längenwachstums durch die Androgene. Auch in der Untergruppe der 17 „präpubertären“ Jungen und Mädchen mit PA fanden sich keine signifikanten Verknüpfungen (Tabelle 18).

Tabelle 18: Regressionsanalysen mit den DHEAS-Werten der 17 präpubertären Kinder mit PA.

Abhängige Variable ¹	1.erklärende Variable x ₁	Modell mit x ₁			2.erklärende Variable x ₂	Modell mit x ₂			Modell mit x ₁ und x ₂			n	
		r _{Pea}	%R ²	p		r _{Pea}	%R ²	p	%R ²	p	p _{x1}		p _{x2}
DHEASres	Leptin _{res}	0.17	6	n.s	BMI-SDS	0.14	2	n.s	6	n.s	n.s.	n.s.	17
DHEASres	BMI-SDS	0.14	2	n.s	Grössen-SDS	0.33	11	n.s	11	n.s	n.s.	n.s.	17

¹ Für die Untersuchung des Androstendion gab es in dieser Untergruppe zu wenig Daten. x₁, x₂ = 1. und 2. in das Regressionsmodell eingebrachte erklärende oder unabhängige Variable, r_{Pea} = Pearsons Korrelations-Koeffizient, %R² = Quadrat von r_{Pea} in Prozent, gibt den Anteil der Variabilität der abhängigen Variablen an, der durch die 1. oder die 2. unabhängige Variable erklärt wird, oder durch beide gemeinsam, p = zugehörige Signifikanz, n.s. = nicht signifikant. p_{x1} = Signifikanz durch Einfügen der 1. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 2. schon enthalten ist, p_{x2} = Signifikanz durch Einfügen der 2. erklärenden Variablen in das Modell, wenn die 1. schon enthalten ist, n = Anzahl der für die Regressionsanalyse zur Verfügung stehenden Daten.

6Diskussion

6.1 In-vitro-Untersuchungen

6.1.1 Hormonwirkungen auf die adrenale Androgenbildung

Die in-vitro-Untersuchungen konnten zeigen, unter welchen definierten Bedingungen humane NNR –Zellen in Kultur in der Lage sind, aufgrund einer IGF- oder Insulin- Wirkung vermehrt Androgene zu bilden (Kapitel 2.2.1.). Grundsätzlich bewirken IGF-I und -II eine signifikante Zunahme der Basalsekretion von Androgenen und Cortisol in humanen NNR-Zellen über die Stimulation der mRNA-Expression von Steroidenzymen, der 17-Hydroxylase und der 3 β -HSD. IGF-I und -II steigern daneben die Kapazität der Steroidhormon-Antwort auf akute ACTH- Stimulation, weil sie die Bildung der ACTH-Rezeptoren fördern. Sie ändern die Antwort auf ACTH, indem die Androstendion-Bildung stärker als die Glukokortikoidsekretion stimuliert wird. Die IGF-induzierte bevorzugte Bildung von Androgenen ist am ehesten bedingt durch eine post-translationelle Steigerung der 17-20-Lyase-Aktivität. Eine überwiegende Zunahme der DHEA-Bildung konnte jedoch durch IGFs nicht bewirkt werden, so dass die 3 β -HSD nicht gehemmt wird, und damit die für die Adrenarche typische Enzymkonstellation nicht hergestellt werden kann.

Gleichfalls neu war die Beobachtung, dass IGF-II in humanen NNR-Zellen stärker als IGF-I wirkt, besonders auf die Androstendion-Bildung. Später wurde dies ebenfalls von anderen Untersuchern bestätigt [93], und auf die Sekretion von Bindungsproteinen zurückgeführt [92], die IGF-I mit höherer Affinität binden, und dadurch seine Wirkung senken. Dass dies im angewandten System keine wesentliche Rolle spielt, zeigten die untenstehend diskutierten Experimente zum autokrinen IGF-System in der NNR. Auch gibt es keine Evidenz dafür, dass IGF-II zusätzlich über den Typ-2-Rezeptor wirkt [93], der in NNR-Zellen exprimiert werden kann [147, 326], und möglicherweise metabolische Wirkungen hat [157].

Insulin zeigt ähnliche Wirkungen wie die IGFs, nicht nur in hohen Konzentrationen, die am IGF-Typ 1-Rezeptor kreuzreagieren, sondern auch in am eigenen Rezeptor wirksamen physiologischen Konzentrationen. Die Ergebnisse von anderen Untersuchern erwiesen später gleichfalls, dass Insulin die 3 β -HSD- und 17-Hydroxylase-Bildung steigert [168]. Allerdings kann damit auch Insulin allein nicht die typische Enzymkonstellation der Reticularis-Zelle induzieren und für die Adrenarche verantwortlich sein.

Wachstumshormon wies in den vorliegenden Experimenten keine direkte Wirkung auf die Steroidsynthese auf, könnte aber in vivo über eine Erhöhung der zirkulierenden IGF-Spiegel wirken. Direkte Wirkungen von Wachstumshormon wurden an humanen NNR bislang nicht beschrieben [229]. Mit sensitiven molekularbiologischen Methoden wurden Wachstumshormon-Rezeptoren in normalen humanen NNR gefunden [206], jedoch ist ihre Bedeutung nicht bekannt.

6.1.2 Bedeutung des autokrinen adrenalen IGF-Systems

Die vorliegenden Ergebnisse haben erstmals gezeigt, dass in NNR-Zellen von Menschen IGF-I sezerniert und durch ACTH stimuliert wird (Kapitel 2.2.2.). Wie IGF-II wird IGF-I in geringen Mengen von humanen adulten NNR-Zellen sezerniert, was zuvor nur von fetalen NNR und NNR-Tumoren bekannt war [146, 147, 227, 228]. Erstaunlich ist, dass die mRNA von IGF-II in gesundem NNR-Gewebe vom Erwachsenen beträchtlich exprimiert wird. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass IGF-II nicht nur, wie bisher angenommen, ein fetaler Wachstumsfaktor ist, sondern auch in der postnatalen Umwandlung und Funktion der Nebennieren-Rinden eine Rolle spielen könnte. Ein kausaler Zusammenhang zwischen postnatalem IGF-II-Absinken und der Involution der fetalen NNR-Zone wurde bereits postuliert [146]. Eine solche physiologische Rolle ist jedoch noch nicht

belegt. Hingegen gilt der Einfluß der ungehemmten IGF-II-Wirkung auf die NNR-Tumorgenese als gesichert [108, 147, 211], sowohl bei sporadischen Tumoren, die eine somatische IGF-II-Mutation zeigen können, als auch bei familiären bzw. genetisch bedingten NNR-Tumoren und IGF-II-Gendefekt, wie z.B. beim Beckwith-Wiedemann Syndrom [272].

In den humanen NNR-Zellkulturen werden IGFBP-2, -3 und -4 gebildet. In nachfolgenden anderen Arbeiten wurde die mRNA-Expression und Sekretion von IGFBP-1 bis -6 in Gewebe [145, 148] und in Zellkulturen von adulten humanen NNR beschrieben [92]. Die lokal sezernierten Bindungsproteine werden in den vorliegenden Experimenten durch ACTH nicht konsistent reguliert, aber durch IGF-I. IGFBP-3 wird durch IGF-I stimuliert. Dieser Befund bestätigt Beobachtungen an Patienten mit Wachstumshormon-Rezeptor-Defekt, deren IGFBP-3 nach 1-jähriger IGF-I-Behandlung ansteigt [155]. Die Sekretion des IGFBP-4 (BP24) wird durch IGF-I reduziert. Der fehlende Einfluss des ACTH auf die IGFBP-Sekretion der NNR wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [53, 145, 148]. Die lokal sezernierten Bindungsproteine scheinen dagegen gemäss unserer Pilotstudie für die Wirkung des IGF keine wesentliche Bedeutung zu haben, wohl aber gibt es Hinweise auf lokale Proteasen, welche die Bindungsaffinität durch Fragmentierung der Proteine senken [27, 87], und dadurch die Bioverfügbarkeit der IGFs in der NNR zu steigern vermögen. Insgesamt erklären die Ergebnisse der NNR-Zellkulturen, wie erhöhte zirkulierende IGF-Spiegel zur Steigerung der NNR-Steroidsynthese beitragen können, insbesondere des Androstendions. Dagegen scheint das autokrin/parakrine System der NNR von geringerer Bedeutung zu sein, als von anderen Geweben, wie den Gonaden, oder anderen Spezies, wie dem Rind, bekannt. Dennoch konnten wir Anhalt dafür gewinnen, dass nicht nur zirkulierendes, sondern auch lokal gebildetes IGF-I oder -II die Wirkung von ACTH auf die Steroidsynthese modulieren kann. Grundsätzlich sind die IGFs für die Aufrechterhaltung der differenzierten adrenocorticalen Funktion notwendig. Dieses adrenale IGF-System ist integriert in ein komplexes regulatorisches System von Peptid-Faktoren, die in Spezies-spezifischer Weise zur Differenzierung der NNR-Zellfunktion beitragen [258].

6.2 IGFs im Modell der Steuerung der adrenalen Androgenbildung beim Menschen

Die Tabelle 19 stellt die in der Einleitung erläuterten bisher erhobenen Mechanismen der adrenalen Androgenbildung und Reticularis-Funktion zusammen. Ziel der eigenen Untersuchungen war es, die Rolle der IGFs und des Insulins in diesem System in vitro zu beschreiben, und auf die Funktion in vivo zu übertragen. Die in-vitro Ergebnisse konnten erstmals darlegen, auf welchen Mechanismen häufig beobachtete Zusammenhänge [132] zwischen metabolischen Auffälligkeiten und dem Krankheitsbild der adrenalen Hyperandrogenämie, wie bei prämaturer Adrenarche und Hirsutismus, beruhen. Unter Berücksichtigung anderer Studien an adipösen oder schlanken Patienten mit Insulinresistenz [13, 139] kann gefolgert werden, dass durch eine Insulinerhöhung einerseits die IGFBP-1-Spiegel sinken, was die Bioverfügbarkeit des IGF-I erhöht [27] und IGF-spezifische Effekte auf die Steroidsynthese der NNR hervorruft [23, 244, 321]. Andererseits kann sich die Insulinerhöhung auch direkt an der NNR auswirken (Kapitel 2.2.1.5. und [168]): über die Zunahme der Steroidsynthesenzyme 3 β -HSD und 17-Hydroxylase wird die Steroidsekretion gesteigert, besonders aber die Androstendion-Bildung. Die in dieser und anderen Studien gezeigten in-vitro-Effekte von IGF und Insulin bestätigen die Hypothese, dass die Hyperandrogenämie bei Frauen, die häufig mit Hyperinsulinämie einhergeht, durch eine überschüssige Bildung 17-hydroxylierter Steroide nach ACTH-Stimulation infolge einer Insulin- und / oder IGF-Wirkung entsteht (Review in [75]). Obgleich unter physiologischen Bedingungen die NNR wenig Androstendion sezerniert (Kapitel 1.3.), kann somit unter unphysiologischen Bedingungen eine vermehrte adrenale Androstendionbildung erfolgen.

Tabelle 19: Mechanismen der adrenalen Androgenbildung. Übersicht der Befunde anderer Autoren (vgl. Kapitel 1) und der eigenen Ergebnisse (vgl. Kapitel 2)

Betroffene Schritte	Bedeutung	Positive Regulatoren
1. Hemmung der 3 β -HSD-Expression	Physiologisch Pathologisch	???, TGF β ↓; Gendefekte
2. Steigerung der 17/20-Lyase-Aktivität	Physiologisch. Pathologisch	Cyt.b5, IGF, Insulin, Leptin Insulin (selten Gendefekte)
3. Abnahme der CYP21-Expression / -Aktivität	Physiologisch Pathologisch	Pseudosubstrathemmung Gendefekte
4. Reticularis-Differenzierung und -Wachstum	Physiologisch	ACTH & Kombination von Wachstumsfaktoren & Durchblutung
5. NNR-Tumoren	Pathologisch	Änderungen wie in 1-4 und weitere Gendefekte

Auf diese Weise ist für alle Zustände, die mit hohem IGF-I einhergehen, oder seiner erhöhten Bioverfügbarkeit, eine Hyperandrogenämie zu erklären. Dazu gehören auch Therapien mit unphysiologisch hohen Wachstumshormon-Dosen, sofern sie zu hohen IGF-I-Spiegeln führen, wie dies eine Untersuchung an Mädchen mit Turner-Syndrom bestätigte [22]. Unter 6-monatiger Therapie mit Wachstumshormon zu Größenverbesserung wurde gezeigt, dass sich IGF-I im Serum verdoppelt, DHEAS signifikant 1,4-fach ansteigt, und dass unter ACTH-Stimulation im Wesentlichen die Sekretion der delta₅-Steroide 17-Pregnenolon und DHEA zunimmt, im Vergleich zu altersgleichen Mädchen ohne eingeschränkte Ovarialfunkt. Auch in vivo nimmt demnach bei IGF-Anstieg die 17-20 Lyase-Aktivität mehr als die 3 β -HSD zu.

Über die Modulation der Steroidsynthese hinaus wirken sich auch die mitogenen Effekte der IGF's und des Insulins auf die NNR aus. Dies zu untersuchen war zwar nicht Ziel der Studie, konnte aber in den NNR-Zellkulturen auch beobachtet werden (Kapitel 2.1.2.). Unter diesem Aspekt ist hervorzuheben, dass bei Erwachsenen ein Zusammenhang zwischen dem Hyperinsulinismus bei metabolischem Syndrom (Syndrom X) und NN-Inzidentalomen beschrieben wurde [273]. Desgleichen konnten wir in einer Pilotstudie an Jugendlichen zeigen, dass bei ausgeprägter Adipositas und Hyperandrogenämie Vergrößerungen und Knoten der NNR kernspintomographisch zu beobachten waren [174], die im Verlauf zurückgingen. Hiervon waren gerade die Patienten betroffen, deren Prämatüre Adrenarche wir als „Exaggerated Adrenarche“ einstufen. Diese wird ihrerseits auch als Folge eines Hyperinsulinismus gedeutet (Kapitel 6.6.2.2.).

Die physiologische Adrenarche lässt sich indessen nur durch ein Zusammenwirken der IGFs und von Insulin mit anderen Faktoren erklären, s. Tabelle 19, die in den in-vivo-Untersuchungen weiter geprüft werden sollten.

6.3 Zusammenhänge zwischen Körperzusammensetzung und Androgenspiegeln

IGF-I hängt seiner Natur gemäss eng mit der Körpergrösse, und auf diese Weise auch mit der Magermasse zusammen [243]. Leptin dagegen ist ein Produkt der Fettzellen, und spiegelt die Fettmasse wider [33, 279]. Vor

der Pubertät sind bei Adipositas die Nebennierenrinden-Androgene erhöht [103, 181, 266]. Dies wurde in der vorliegenden Untersuchung bestätigt; neu sind die Befunde, dass vor Einsetzen der gonadalen Aktivität der BMI mit der NNR-Androgen-Sekretion korreliert [181]. In Bezug auf DHEAS kann Leptin eines der vermittelnden Signale sein, und es spiegelt wohl die Fettmasse wider. Die Androstendion-Spiegel korrelieren dagegen nicht nur mit dem BMI, sondern zeigen darüber hinaus eine zusätzliche Assoziation mit IGF-I. Es ist anzunehmen, dass vorwiegend die Grösse bzw. Magermasse durch IGF-I signalisiert wird (Abbildung 32).

Während der Pubertät bestehen bei normalgewichtigen Kontrollen die Korrelationen wie in der Präpubertät weiter. Bei Pubertären mit Adipositas dagegen ist die Erhöhung der adrenalen Androgene weniger deutlich und ohne Zusammenhang zu BMI, Leptin und IGF-I. Demnach ändert sich die positive Korrelation zwischen Körpermasse und NNR-Androgenen in der Pubertät [181]. Dies kann Folge der gonadalen Steroidsekretion und ihrer unabhängigen Wirkungen auf die untersuchten Kovariaten sein: Östrogene steigern die IGF-I Spiegel [46, 51], und Testosteron senkt die Leptin-Konzentrationen [323]. Da es sich um eine Querschnittstudie handelt, kann naturgemäss über die Sequenz der Beobachtungen keine Aussage gemacht werden. Dank anderer longitudinaler Untersuchungen kann man davon ausgehen, dass tatsächlich erst Wachstum bzw. die IGF-Spiegel ansteigen, und konsekutiv die NNR-Androgene [274, 275]. Dies bestätigt den Einfluss der in vitro gezeigte Stimulation der NNR-Androgene durch IGF-I auch auf die Adrenarche. Eine vergleichbare Sequenz wurde für den Leptin-Anstieg und den Beginn der Hodenfunktion gezeigt [218]. Des weiteren bezeugen ähnliche longitudinale Untersuchungen an Primaten, dass die Körpermasse und mit ihr verbundene Signale, Leptin und IGF-I, ansteigen, und die Pubertätsentwicklung fördern [311]. Erhöhte IGF- und Insulinspiegel korrelieren mit den NNR-Androgenen, auch in anderen Studien, in denen Mädchen und Frauen mit Polycystischem-Ovar-Syndrom [321] oder Adipositas untersucht wurden [216, 324]. Die Entwicklung eines PCOS aus einer adrenalen Hyperandrogenämie wird in Kapitel 6.7.3. erörtert. Warum finden andere Untersucher keinen oder einen negativen Zusammenhang zwischen NNR-Androgenen und IGF-I bzw. Insulin, selbst bei präpubertären Kindern nicht [116, 315]? Zum einen wurden in beiden Studien die Effekte von Alter und Gewicht auf IGF-I und die NNR-Androgene nicht berücksichtigt. Es ist aber eine Korrektur für diese Variablen notwendig, um einen signifikanten Zusammenhang zwischen IGF-I und DHEAS bzw. Androstendion zu erkennen, wie in dieser Studie belegt (Abb. 23 und Tabelle 7). Zum anderen kann es sein, dass die beobachteten positiven Zusammenhänge tatsächlich nur für Mädchen relevant sind, und nicht für Jungen, ähnlich wie es für die geschlechtsabhängige Insulinwirkung auf DHEAS bei Erwachsenen gezeigt wurde [150, 236]. Der Anteil an Jungen war in meiner Untersuchung zu klein, um signifikante Geschlechtsunterschiede ablesen zu können.

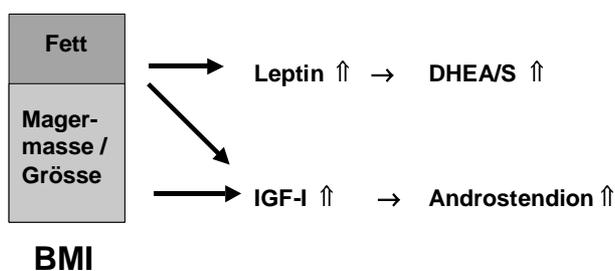


Abbildung 32: Schematische Darstellung der potentiellen Einflüsse der Körperzusammensetzung auf die NNR-Androgene

Leptin zeigte hier [181] wie in anderen Untersuchungen an Kindern mit PA und Frauen [43, 137] positive Korrelationen mit zirkulierenden Androgenen, die jedoch nicht über die Effekte des BMI auf die Androgene hinausgingen. Während in vivo ein direkter Zusammenhang zwischen DHEA/S und Leptin gefunden wurde (Kapitel 3 und 4), erwies sich in vitro, dass hohe Konzentrationen von Leptin (100-1000 ng/ml) die Steroidsynthese hemmen, über eine Suppression der CYP17-Expression [112], und dass niedrigere Konzentrationen die DHEA-Bildung steigern [31]. Auf diese Weise können scheinbar widersprüchliche Ergebnisse zustande kommen: während bei geringerer Adipositas mit entsprechenden Leptinspiegeln positive Zusammenhänge zwischen NNR-Funktion und Leptin zu finden sind, wie hier, können bei ausserordentlich hohen Leptinspiegeln, wie sie vorwiegend bei extremer Adipositas und eher im Erwachsenenalter gefunden werden, negative Korrelationen entstehen.

Grundsätzlich gilt daher für die Mediatoren der Körpermasse, Leptin, IGF-I und auch Insulin, dass die bei Erwachsenen beobachteten meist negativen Korrelationen mit den NNR-Androgenen nicht auf Kinder übertragen werden können. Andererseits scheint die beobachtete Regulation von NNR-Androgenen in Abhängigkeit von IGF-I, Leptin und Adipositas nur vor der Pubertät zu bestehen, weil nach Einsetzen der Gonadenfunktion die Mediatoren der Körpermasse zusätzlich von den Gonadenhormonen beeinflusst werden. Die Insulin-Effekte bestehen hingegen weiterhin, wie untenstehend besprochen.

6.4 Das Prader-Willi-Syndrom als Modell der NNR-Androgen-Regulation über Mediatoren der Körperzusammensetzung

Auch beim Prader-Willi-Syndrom ist die Erhöhung der NNR-Androgene mit Hormonen verknüpft, die von der Körperzusammensetzung und dem Wachstum abhängen, nämlich Leptin, Insulin und IGF-I (Kapitel 4, [172]). Leptin korreliert beim PWS sehr gut mit der erhöhten Fettmasse. Ein Bezug besteht vorwiegend zwischen Leptin und DHEA und scheint auf der Induktion der DHEA-Synthese zu beruhen, wenn man die in vitro-Ergebnisse zugrunde legt [31].

Je höher die Insulinspiegel vor Therapie, und je grösser die Insulinresistenz, desto höher sind die DHEAS-, aber auch die DHEA-Spiegel. Diese Beobachtung gleicht der bei Prämaturer Adrenarche [132, 321]. Gleichwohl liegen Insulin und IGF-I-Spiegel trotz der erhöhten Fettmasse bei PWS eher niedriger [76, 80, 208], als bei der einfachen Adipositas [61, 63]. Offenbar findet die in vitro beschriebene Regulation bei niedrigeren Insulin-Spiegeln statt, weil durch den begleitenden Wachstumshormonmangel die Sensitivität gegenüber Insulin erhöht ist.

Darüberhinaus liess sich ein ganz neuer Aspekt aus den Beobachtungen bei PWS gewinnen: Die Hyperinsulinämie scheint spezifisch DHEAS, mehr als DHEA, zu erhöhen, und damit den Pool an DHEAS zu vergrössern. Möglicherweise reguliert Insulin die Sulfotransferase positiv. Hierzu gibt es gleichartige Beobachtungen an einer kleinen Zahl von in vitro NNR-Versuchen [125], sowie an db-Mäusen [202]. Vermutlich führt die Hyperinsulinämie bei Insulinresistenz zur Aktivierung der ras-Kinasen und zur Induktion weiterer Gene, zu denen auch die Sulfotransferase gehören könnte, während die Resistenz nur die Glucose-Homöostase betrifft, und über den PI_3 -Weg läuft [170].

IGF-I hingegen erklärt massgeblich die Spiegel des DHEA und Androstendion, ähnlich wie bei den Gesunden und Adipösen in dieser und in anderer Studien [110, 324]. IGF-I scheint hinsichtlich der DHEA-Synthese einen von Insulin unabhängigen, additiven Effekt zu haben, wie aus der multivariaten Regressionsanalyse hervorgeht. Diese Beobachtung bestätigt die in vitro-Versuche, die zeigen, dass offenbar sowohl IGFs, als auch Insulin in

an ihren eigenen Rezeptoren wirksamen Konzentrationen Effekte auf die Steroidbiosynthese hervorrufen. Aus der longitudinalen Therapiebeobachtung bei PWS lässt sich ein über den Altersanstieg hinausgehender Anstieg des DHEA beobachten, der auf die Erhöhung der IGF-Spiegel unter Behandlung mit Wachstumshormon und die konsekutive Steigerung der Steroidsynthese zurückzuführen sein könnte. Allerdings korrelieren unter Wachstumshormon-Therapie nur noch Leptin mit DHEA, sowie IGF-I mit Androstendion. Weitere zuvor untersuchten Zusammenhänge zwischen den Androgenen und den Variablen der Körperzusammensetzung werden verdeckt, weil wahrscheinlich der direkte Einfluss des Wachstumshormons auf den zellulären Metabolismus einerseits [285, 293], und auf die Insulinsensitivität andererseits [210] die an den Serumspiegeln ablesbaren IGF- und Insulin-Effekte überspielt.

Die bei Gesunden beobachteten Zusammenhänge zwischen BMI und Androgenen bestehen nicht bei PWS. Dafür scheint die bei diesen Patienten pathologisch zugunsten der Fettmasse verschobene Körperzusammensetzung verantwortlich sein [79]. Aus der fehlenden direkten Korrelation zwischen Fett- bzw. Magermasse und Androgenen bei PWS kann abgeleitet werden, dass die Androgenspiegel wesentlich von den Mediatoren der Körpermasse abhängen, wie Insulin, Leptin und IGF-I, und weniger von der Körperzusammensetzung selbst. Die Fehlregulation der Körperzusammensetzung beim PWS ist vermutlich durch einen hypothalamischen Defekt bedingt, aber diese noch unbekannt Variable konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht mit berücksichtigt werden. Dadurch kann indessen der fehlende direkte Zusammenhang zwischen Körperzusammensetzung und Androgenen begründet werden.

6.5 *Steuerung der physiologischen Adrenarche*

Die physiologische Adrenarche lässt sich nicht durch einen einfachen Steuerungsvorgang erklären. Morphologisch und funktionell ist die Reifung der Zona Reticularis ein langsamer Prozess, der zahlreiche Informationen integriert (s. Tabelle 19). Die Adrenarche ist massgeblich mit Wachstum und Gedeihen verbunden, wie aus longitudinalen klinischen Untersuchungen hervorgeht [246, 274]. Die vorliegenden in-vivo-Untersuchungen konnten erstmals zeigen [181], dass die Androgenspiegel mit sezernierten Wachstumsfaktoren zusammenhängen. Eigene und andere Ergebnissen bestätigen die Somatostat-Hypothese auch für die Adrenarche, indem vor Einsetzen der gonadalen Aktivität IGF-I meist mit Androstendion korreliert, und somit den Zustand des Längenwachstums widerspiegelt [243], während Leptin mit DHEAS korreliert ist, und die Fettmasse signalisiert [33, 279]. Beide Faktoren können sowohl lokal auf die steroidbildenden Organe, als auch hypophysär-hypothalamisch wirken, und auf den Verlauf der adrenalen bzw. gonadalen Reifung Einfluss nehmen. Aus den invitro-Untersuchungen kann gefolgert werden, dass Insulin und IGFs die sekretorische Kapazität der NNR fördern und vorwiegend die $\Delta 4$ -Steroid-Produktion und Abspaltung der Seitenkette an C17 vermitteln, was aber nicht das typische Sekretionsmuster der Adrenarche mit hohem DHEA/S erklärt. Es müssten zahlreiche in vitro untersuchte Faktoren zusammenwirken, um die Steroidsynthese so zu regulieren, dass das Sekretionsmuster der Adrenarche zu erklären ist [258] (Tabelle 19). Alle gegenwärtigen Hypothesen [4, 128, 286, 306] und die eigenen Untersuchungen vereinigend kann angenommen werden, dass die Adrenarche ein lokal gesteuerte Prozess ist, dessen Voraussetzung das Wachstum der Zona Reticularis ist. Dass IGFs und Insulin Mitogene für die NNR-Zelle sind, wurde hier und in zahlreichen anderen Untersuchungen belegt. Jedoch ist keine Studie bekannt, die den Einfluss von IGFs und Insulin speziell auf das Reticularis-Wachstum beschrieben hat.

Eine Regulation der physiologischen Adrenarche durch einen hypothalamisch-hypophysären Faktor ist nach derzeitigem Wissensstand unwahrscheinlich, und mit einfachen Methoden bisher nicht nachweisbar gewesen

(s. Kapitel 1.4.2. und [278]). Allenfalls in pathologischen Zuständen wird eine prämatüre Adrenarche durch zentrale Prozesse ausgelöst, wie bei Hydrocephalus oder Glucocorticoid-Resistenz [309] beschrieben.

6.6 Ursachen der Prämaturen Pubarche

Die Prämatüre Pubarche stellt eine Manifestationsform der Hyperandrogenämie von Kindern zwischen dem Neugeborenen- und Pubertätsalter dar. Herkömmlich lassen sich 2 klassische Differentialdiagnosen von der idiopathischen Prämaturen Adrenarche abgrenzen, Nebennieren- oder Ovarial-Tumoren und Enzymdefekte, deren oben (Kapitel 5.3.) beschriebene Häufigkeit und Besonderheiten in der Berliner Population nachfolgend diskutiert werden.

6.6.1 Organische und genetische Defekte als Ursache der Prämaturen Pubarche

6.6.1.1 Tumoren

Nebennierenrinden-Tumoren betrafen in der vorliegenden Untersuchung einen Anteil von 5 % aller Mädchen mit Prämaturer Pubarche, und keinen Jungen. NNR-Tumoren treten bei Mädchen im Kleinkindesalter 5 mal häufiger als bei Jungen auf, während sich im Adoleszentenalter die Geschlechtsverteilung angleicht (1:1) [209]. Dennoch muss auch bei Jungen mit Prämaturer Pubarche nach einem Tumor gesucht werden, da wir wie andere Autoren zeigen konnten, dass die idiopathische PA bei Jungen über 4 mal seltener als bei Mädchen vorkommt (Reviews in [21, 132, 241]), während die Prävalenz der symptomatischen Prämaturen Pubarche bei Jungen etwas erhöht ist (Kapitel 5.1.). Die Diagnose eines Carcinoms kann eine sehr schlechte Prognose bedeuten, so dass jeder NNR-Tumor, der bei Kindern ab einer Grösse von 2,5 cm Carcinom-verdächtig ist [39], baldmöglichst operativ entfernt werden muss. Die Sonographie der NNR gehört zu jeder Diagnostik der Prämaturen Pubarche, und zwar um so dringlicher, je jünger das Kind ist, je deutlicher Zeichen der Hyperandrogenämie sind und um so „bizarrer“ das Muster und ausgeprägter die Sekretion der Androgene sich darstellen [163]. Die in der vorliegenden Studie und in anderen Populationen beschriebenen Verläufe [277] weisen darauf hin, dass ein systematisches Tumorscreening bei atypischer Prämaturer Pubarche bzw. früh-manifester oder rasch progredienter PA, und eine unmittelbare Therapie für die Kinder mit diesen Tumoren nicht nur ein Überleben, sondern normales Wachstum und Entwicklung sichern können.

6.6.1.2 Nicht-klassisches AGS bei NNR-Enzymdefekten

Der nicht-klassische 21-Hydroxylase-Defekt kann eine atypische Adrenarche mit Virilisierung oder deutlicher Skeletalterakzeleration um mehr als 2 Jahre hervorrufen, wie hier und anderweitig beschrieben (Reviews in [21, 132, 241]). Die Jungen mit Enzymdefekt hoben sich hier lediglich durch das frühe Manifestationsalter hervor, was in anderen Studien nicht erwähnt wurde, während eine frühe Manifestation bei den Mädchen mit LO-21-OHD nicht diagnoseweisend war. Ein nicht-klassischer 21-Hydroxylase-Defekt wurde bei 5 % der Mädchen mit Prämaturer Pubarche und 22 % der Jungen gesichert, bzw. bei 11 % der Jungen, wenn man die Brüder als einen Fall bewertet. Ein nicht-klassischer 3 β -HSD-Mangel dagegen konnte nach aktuellen Kriterien aufgrund der nur mässigen Erhöhung der stimulierten Δ 5-Steroide nicht diagnostiziert werden. Die Prävalenz des 21-OH-Mangels liegt in den Studien, die wie die vorliegende eine atypische Manifestation der Prämaturen Pubarche einschliessen, bei 3,4 bis 36 %, und bei denen, die Kinder mit Virilisierung oder massiver Skeletalterakzeleration ausschliessen, zwischen 0 und 30 %. Ausgehend von den Berliner Daten und denen einer französischen Population [271] ist in Mitteleuropa bei Prämaturer Pubarche am ehesten mit einer Prävalenz von 5 % -12 % an Kindern mit 21-Hydroxylase-Mangel zu rechnen.

Eine Substitution mit Hydrocortison ist bei biochemisch oder molekulargenetisch gesichertem nicht-klassischem AGS indiziert, sobald klinische Symptome auftreten, wie die vorzeitige Schambehaarung [238]. Wird zufällig, oder im Neugeborenen-Screening, ein erhöhtes 17-OHP gefunden, und fehlen klinische Symptome selbst bei molekulargenetisch gesichertem nicht-klassischem AGS, ist zunächst keine Therapie erforderlich [178, 182]. Hinzu kommt, dass gerade bei mildem AGS der Anteil an neuen Mutationen grösser als bei klassischem AGS ist, und nur durch Sequenzierung gefunden würde sowie funktionell charakterisiert werden müsste [188]. Bei gründlicher Suche sind wahrscheinlich noch häufiger Mutationen zu finden, was jedoch unter Berücksichtigung des Kosten/Nutzen-Verhältnisses nur selten indiziert sein mag. Streng genommen ist die Kenntnis des Genotyps nur für die pränatale Diagnostik erforderlich, um bei Kinderwunsch das Risiko für ein ungeborenes Mädchen, eine schwere AGS-Form zu entwickeln, möglichst genau einschätzen zu können und zu behandeln.

Wie intensiv ist bei Patienten mit Prämaturer Pubarche nach einem Enzymdefekt mittels ACTH-Test zu suchen?

Viele Autoren empfehlen, den Test immer durchzuführen, da die Patienten mit nicht-klassischem AGS sich oft klinisch und anhand der basalen Hormonwerte nicht von denen mit idiopathischer PA unterscheiden lassen [119, 131], obgleich alle Berliner Kinder mit nicht-klassischem AGS erhöhte Basalwerte des 17-OHP hatten. Weil aber eine therapeutische Konsequenz aus dem AGS nur gezogen würde bei Symptomen der atypischen Adrenarche, oder über das Pubertätsstadium hinaus erhöhten Androgenen, genügt es nach Ansicht der meisten Autoren, zielgerichtet therapie relevant vorzugehen, und einen ACTH-Test nur dann durchzuführen, wenn progrediente Skelettreifungsbeschleunigung, massive Androgenisierungszeichen, Zyklusstörungen oder für das Pubertätsstadium erhöhte Spiegel des Testosteron, Androstendion oder DHEAS auftreten [233, 287]. In jedem Fall bleiben, wenn ein Enzymdefekt oder auch Tumor nicht ausgeschlossen sind, klinische Verlaufuntersuchungen solange nötig, bis die Progredienz der Androgenisierung eingeschätzt werden kann [232]. Sind solche Kontrollen nicht möglich, muss die Indikation des ACTH-Testes grosszügiger gestellt werden.

6.6.2 *Mögliche Differentialdiagnosen bei Prämaturer Adrenarche*

Nach Ausschluss obengenannter Diagnosen werden die Patienten üblicherweise als „idiopathische“ PA klassifiziert. In der untersuchten Berliner Population trifft dies initial auf der 85 % Mädchen zu, und auf 78 % der Jungen, die wegen Prämaturer Pubarche vorgestellt wurden. Da unklar ist, auf welcher pathophysiologischen Basis sich die sogenannte idiopathische PA entwickelt, wurden folgende Ursachen geprüft (Kapitel 5.4) und untenstehend diskutiert: die Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Mangel, die „Exaggerated Adrenarche“ bzw. 3 β -HSD-Insuffizienz und die Adipositas. Des Weiteren wird die Aktivierung von CRH als Ursache der NNR-Androgen-Sekretion angenommen. In der Arbeitsgruppe um Chrousos wurde aus einer Pilotstudie geschlossen, dass aufgrund des Zusammentreffens von Prämaturer Adrenarche, erhöhten Cortisol-Spiegeln, ängstlich-depressiver Verhaltensauffälligkeit und Adipositas eine zentrale Aktivierung der NNR-Achse durch CRH-Hypersekretion vorliegen könnte [47]. Ob zusätzlich CRH einen direkten stimulierenden Effekt auf die DHEAS-Synthese nicht nur während der Fetalperiode [303], sondern auch postpartal aufweist [133, 134], ist ungewiss.

6.6.2.1 *Manifestation bei Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Mangel*

Lange Zeit war nicht klar, ob es eine Untergruppe von Kindern gibt, bei denen eine Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Mangel sich offensichtlich in der Form einer Prämaturen Adrenarche zeigt (Diskussion in [21]). 1986 fand Knorr [162] bei 75 Kindern mit Prämaturer Pubarche einen Anteil von 41 % an Kindern mit überschüssiger 17-OHP-Stimulierbarkeit, im Vergleich zu genetisch untersuchten Kontrollen ohne 21-OH-

Defekt, so dass vermutet wurde, auch der heterozygote Steroidsynthese-Enzymdefekt bei Überträgern des 21-Hydroxylase-Mangels könne zur PA führen. Von allen wegen Prämaturer Pubarche untersuchten Berliner Kindern zeigten gemäss Nomogramm 25 % eine Erhöhung der ACTH-stimulierten 17-OHP-Spiegel, wie sie bei Heterozygoten für den 21-Hydroxylase-Mangel charakteristisch, aber nicht beweisend ist. Die Inzidenz der erhöhten Werte im ACTH-Test liegt damit etwas niedriger, als die kürzlich angegebene aus den Vereinigten Staaten [330] und dem Mittelmeerraum [56]. Dort betrug der Anteil der molekulargenetisch gesicherten Patienten mit Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Mangel 35 % bzw. 37,5 % der untersuchten Kinder mit PA. In diesen Studien lag die Prävalenz dann niedriger, wenn man nur die ACTH-Tests betrachtete, da nicht alle, die einen betroffenen Genotyp aufwiesen, eine pathologische Stimulierbarkeit des 17-OHP erkennen liessen, sondern nur 50 bis 76,5 % [56, 162, 330]. Wie hoch ist andererseits der Anteil vermeintlich Heterozygoter, die mittels ACTH-stimuliertem 17-OHP falsch positiv diagnostiziert werden, einzuschätzen? Aufgrund der Genotypisierung konnte gezeigt werden, dass ungefähr 5 % der weiblichen Individuen mit normalem 21-Hydroxylase-Gen eine erhöhte 17-OHP-Stimulation aufweisen, und demnach falsch positiv klassifiziert würden [330]. Im übrigen könnte durch Untersuchung spezifischer Steroidmetabolite, 11-Desoxycorticosteron und 21-Desoxycortisol, die allerdings in dieser Studie nicht vorgesehen waren, die diagnostische Treffsicherheit des biochemischen Heterozygotentests deutlich verbessert werden [88, 263].

Auch bei hirsuten Frauen ist der Anteil der Überträgerinnen für einen 21-Hydroxylase-Mangel auf 35 % erhöht, im Vergleich zu 6 % in der untersuchten Allgemeinbevölkerung [330]. Während weitere Studien die Annahme einer möglichen klinischen Manifestation der Heterozygotie bestätigen (Review in [188]), steht dem die Untersuchung an obligat heterozygoten Müttern von Kindern mit AGS gegenüber, die keine erhöhte Prävalenz der Hyperandrogenämie im Vergleich zur Kontrollgruppe haben [160]. Nun sind prospektive Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung des 21-OH-Mangel-Carrierstatus für den Hirsutismus durchzuführen. Es werden Faktoren gesucht, die die Hyperandrogenämie bei den Heterozygoten fördern, oder auch vor ihr schützen. Zu ersteren Faktoren gehören sicher die in dieser Studie untersuchten Variablen, neben Insulin und dem IGF-System zusätzliche mit der Adipositas assoziierte. Nichtsdestotrotz müssen neben dem Enzymdefekt weitere Störungen der PA zugrunde liegen, da nur ein Teil der PA-Patienten von der Heterozygotie für den 21-Hydroxylase-Defekt betroffen ist.

Es gab bisher noch keine klinische Arbeit in Mitteleuropa, die initiale Unterscheidungsmerkmale und den Langzeitverlauf der Kinder mit Prämaturer Pubarche untersucht hat. Erstmals konnte hier gezeigt werden (Kapitel 5.4. und 5.5.), dass die Gruppe der Kinder mit Verdacht auf Heterozygotie des 21-Hydroxylase-Mangels durch eine schlechtere initiale Wachstumsprognose als die anderen Gruppen gekennzeichnet ist. Die Skelettreife ist bei diesen Patienten deutlicher als die Wachstumsgeschwindigkeit erhöht, so dass das verbleibende Wachstumspotential reduziert zu sein scheint. Dennoch ergibt sich aus den vorliegenden Nachuntersuchungen an einer kleinen Gruppe kein Hinweis darauf, dass die Patienten mit PA als Manifestation der Heterozygotie für einen 21-Hydroxylase-Mangel eine deutlich eingeschränkte Endgrössenprognose haben. Ferner sind Akne und Hirsutismus, die klinischen Zeichen der Hyperandrogenämie, bei den Adolescentinnen dieser Gruppe nicht häufiger in den anderen PA-Subgruppen. Langzeitverläufe an grösseren Gruppen mit PA und Heterozygotie für den 21-Hydroxylasemangel zu untersuchen wäre zur weiteren Klärung von notwendig.

6.6.2.2 *Exaggerated Adrenarche bzw. 3 β -HSD-Insuffizienz*

Patienten mit Prämaturer Pubarche und „Exaggerated Adrenarche“ weisen biochemisch erhöhte Δ^5 -Steroide auf, z.B. DHEAS, ohne dass in den meisten Fällen ein genetischer Defekt der 3 β -HSD identifiziert werden konnte [214, 289]. Diese 3 β -HSD-Insuffizienz wird von einer erhöhten generalisierten NNR-Stimulierbarkeit nach ACTH-Gabe begleitet, deren Ursache unklar ist (s. Einleitung 1.6.3.), und die nicht mit Übergewicht

einhergehen muss. Klinisch fielen in der Berliner Gruppe die betroffenen Patienten durch rasches Wachstum und eine initial gute Wachstumsprognose auf. Zur Endgrösse kann aufgrund der Daten keine Aussage gemacht werden. Jedoch ist der Grössen-SDS normal in der mindestens 2-jährigen Verlaufskontrolle. Oft zeigt sich bei diesen Kindern gleichzeitig eine beschleunigte gonadale Pubertätsentwicklung [195]. Dieses Krankheitsbild scheint bei Erwachsenen in die Funktionelle Adrenale Hyperandrogenämie (FAH) einzumünden [135, 281], und hieraus ist die sekundäre Entwicklung eines Polycystischen Ovar-Syndroms möglich (s. dazu Kapitel 6.7.3.). Als Pathogenese noch umstritten sind die Dysregulation der 17-Hydroxylase [15, 94, 282] und die endogene hypothalamisch-hypophysäre Überstimulation der NNR [191]. Aufgrund neuerer Untersuchungen wird als Ursache der Funktionellen Adrenalen Hyperandrogenämie eine der NNR innewohnende Regulationsstörung angenommen, bei der die NNR-Sensitivität gegenüber ACTH deutlich gesteigert ist, ohne dass ACTH selbst vermehrt gemessen werden muss [14]. Die ACTH-Antwort der NNR-Androgene ist möglicherweise durch lokale Wirkung von Insulin oder Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren verstärkt, die die Kapazität der NNR-Steroidsynthese erhöhen [14], wie in der vorliegenden Studie und in anderen klinischen Untersuchungen gezeigt wurde [244, 321, 322]. Die hier identifizierten und in Kapitel 6.3. diskutierten *in vitro*-Mechanismen der Steigerung der Steroidbiosynthese und Mitogenese der NNR könnten so ihren klinischen Ausdruck finden.

6.6.2.3 *Adipositas*

Für eine frühe Manifestation der PA spielt die Adipositas keine wesentliche Rolle, denn bei den präpubertären Kindern mit isolierter vorzeitiger Schambehaarung sind nur 11,4 - 12,5 % adipös (s. Kapitel 5.4.). Je jünger also die Mädchen sind, desto weniger häufig ist die PA von einer Adipositas begleitet. Dagegen fällt auf, dass von den Adolescentinnen mit Hyperandrogenämie und Anamnese einer PA ein deutlich höherer Anteil adipös ist, nämlich 39 %. Bei den Jungen manifestiert sich die PA weniger früh, als bei den Mädchen, und die Prävalenz der Adipositas ist bei jenen häufiger (14 – 60 % in den vorliegenden Untersuchungen). Bei Gesunden korrelieren der BMI und Leptin mit DHEAS oder DHEA, und sind gemeinsam für bis zu 26 % der DHEA/S-Varianz verantwortlich, bei PA hingegen ist dies nicht der Fall. Sicher ist die fehlende Korrelation zum Teil Ausdruck des Selektionseffektes der PA-Studienpopulation. Aber auch wenn in der Studie an 33 Patienten mit Hyperandrogenämie Leptin für den BMI korrigiert wird, mit dem es bei PA wie bei Gesunden hervorragend korreliert, zeigt es keinen Unterschied zwischen PA und Kontrollen (Kapitel 5.6., [181]). Gleichermassen fand sich in einer anderen Studie keine Korrelation zwischen dem BMI und Androgenen bei PA [47]. Vermutlich ist das Übergewicht bei PA nicht Auslöser der Androgenämie. Die Adipositas kann aber bei Kindern mit PA zusätzlich Einfluss nehmen, und scheint vor allem die Erhöhung der basalen Steroid-Spiegel zubewirken [149]. Die Untersuchungen an Kindern mit PWS, die alle eine zu hohe Fettmasse haben, konnten eine Korrelation zwischen zirkulierenden Körpermasse-assoziierten Hormonen und den Androgenen zeigen, aber nicht mit der Körperzusammensetzung an sich (s. Kapitel 6.4., [172]). Andere Untersuchungen an Mädchen mit Adipositas und PA bestätigen, dass ein Hyperinsulinismus und die nachfolgende Steigerung der IGF-I-Aktivität eine Korrelation mit der Hyperandrogenämie aufweisen [244, 296]. Nur wenn das Übergewicht mit einem Hyperinsulinismus verknüpft ist, folgt die Aktivierung der NNR-Androgene [135, 139], wie auch bei erwachsenen adipösen Frauen [72]. Demnach wäre die bei Adipositas bestehende Hyperandrogenämie zu einem Teil identisch mit dem, was als Exaggerated Adrenarche bezeichnet wird (s. Kapitel 6.6.2.2.).

Darüber hinaus könnte die Adipositas verstärkend auf die Androgenbildung wirken, indem sie die periphere Metabolisierung zu aktiven Androgenen fördert (vgl. Kapitel 1.3.3.), und auf diese Weise für Ausmass und Andauern der Hyperandrogenämie verantwortlich sein. Als Hinweis dafür kann dienen, dass die Androstendion-Spiegel bei 2 adipösen Mädchen besonders hoch waren, aber diese Hypothese muss an einer grösseren Patientenzahl geprüft werden. Andererseits gibt es auch Hypothesen, dass durch die Hyperandrogenämie

selbst Insulinresistenz und Adipositas gefördert werden [69, 305]. In der vorliegenden Studie aber war eine Zunahme des Relativgewichtes während der im Mittel fünfeinhalb jährigen Beobachtung nicht zu finden, wie auch in einer Nachuntersuchung von süddeutschen Patientinnen nicht [332]. Gleichwohl ist es nicht ausgeschlossen, dass die Hyperandrogenämie bei Frauen und die Adipositas einen wechselseitigen sich verstärkenden Effekt haben, der möglicherweise in einigen Bevölkerungsgruppen, wie Südeuropäern oder Schwarzen, stärker hervortritt [68].

6.7 *Konsequenzen aus der Berliner Nachbeobachtung für Diagnostik und Therapie bei PA*

Zu drei therapeutisch relevanten klinischen Besonderheiten bei der PA können wir anhand des natürlichen Verlaufes der PA bei Berliner Patienten Stellung nehmen, und daraus Vorschläge für das diagnostische und therapeutische Vorgehen ableiten: Wachstum und Endgrösse, Hirsutismus und Ovarialfunktion.

6.7.1 *Wachstum und Endgrösse*

In der vorliegenden Studie ist die Körpergrösse bei Erstuntersuchung schon erhöht und wie die Skelettreifung nicht zunehmend beschleunigt. Dadurch verbessert sich die initial reduzierte Endgrössenprognose. Tatsächlich liegt die Endgrösse, die bei 10 Mädchen mit PA ohne Therapie gemessen wurde, über der ersten Prognose. Auch andere Studien zeigten, dass die Beschleunigung des Wachstums bei PA früh auftritt, dass es während der Pubertät zur ausgleichenden Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit und Knochenreifung kommt, und dass die Endgrösse im Elternzielbereich liegt [106, 144, 328]. Es ist für finnische Mädchen mit PA gezeigt worden, dass der Wachstumsschub schon im 3. Lebensjahr beobachtet werden kann, deutlich vor Manifestation der PA [261]. Lediglich scheint es einige Patienten zu geben, deren Skelettreifung rasch voranschreitet, deren Endgrössenprognose sich verschlechtert, und die möglicherweise einer Therapie bedürfen. In der hier untersuchten Population fielen die Kinder mit Heterozygotie des 21-Hydroxylase-Defektes durch signifikant schlechtere Grössenprognosen auf. Eines dieser Mädchen wurde wegen der progredienten Skelettreifung mit Cyproteron-Acetat behandelt, obwohl es keine Studien gibt, die den Erfolg dieser Therapie bei PA hinsichtlich der Endgrössenverbesserung belegen. Grundsätzlich fehlen auch noch Langzeitstudien, die bestätigen, dass die Wachstumsprognose bei den manifesten Heterozygoten eingeschränkt ist, oder dies widerlegen. Bis dahin kommt der Diagnose der Heterozygotie des 21-Hydroxylase-Defektes nur insofern eine Bedeutung zu, als dass, neben der genetischen Beratung, eine engmaschige Kontrolle des Wachstums erforderlich ist, um ggf. eine Therapie einleiten zu können. Ob diese dann besser in einer niedrigdosierten Hydrocortison-Substitution oder Cyproteron-Actetat-Gabe bestehen soll, ist noch offen

6.7.2 *Hirsutismus*

Die Hyperandrogenämie der Mädchen mit PA scheint bis ins Erwachsenenalter zu persistieren. Grundsätzlich stellt sich bei Gesunden ab der Pubertät ein individuell recht konstanter Bereich der Androgenspiegel ein, so dass die Höhe der peripubertären Androgensekretion während der gesamten Fertilitäts-Periode bestehen bleibt [7]. Dementsprechend ist das Auftreten des Hirsutismus nach PA auch in unserer Nachuntersuchung mit 29% deutlich höher, als allgemein bei erwachsenen Frauen zu erwarten, nämlich 7% [12, 161]. Auch bei spanischen Adolescentinnen nach PA wird der gleiche Anteil an Mädchen mit adrener Hyperandrogenämie (30%) gefunden [135]. Leider kann aber wie in unserer Untersuchung auch dort kein Zusammenhang zwischen den Androgenspiegeln während der vorzeitigen Adrenarche und denen im Erwachsenenalter gefunden werden.

Daher hat bei PA die Höhe der DHEAS-Spiegel im Einzelfall keinen prädiktiven Wert für die Hyperandrogenämie, anders, als die obengenannte longitudinale Studie an gesunden Adolescentinnen suggeriert [7]. Weiterhin ist weder bei Hirsutismus, noch bei Akne in der Berliner Patientengruppe die Prävalenz der Patienten mit überschüssiger 17-OHP-Stimulation erhöht, so dass der Überträger-Status des 21-OHD allein für diese Formen der Androgenisierung nicht bedeutend ist, wie auch aus Daten anderer Populationen gefolgert wurde (Review in [18, 245, 301]). Der Hirsutismus adrenalen Ursprungs scheint somit nach Ausschluss eines nicht-klassischen AGS in unserer Population keiner weitergehenden Suche nach einem heterozygoten Enzymdefekt zu bedürfen.

6.7.3 Ovarialfunktion

Bei den Berliner Patientinnen ist das Menarchealter verfrüht, im Vergleich zur Mutter und zur Population, liegt aber mit 12 Jahren immer noch im Normbereich. Dies wurde bisher nur in der Studie an finnischen Mädchen beobachtet [261], nicht jedoch bei spanischen [144] und italienischen [106]. Die Bedeutung dieses Befundes ist noch nicht sicher einzuschätzen, aber vielleicht nicht völlig harmlos, da es neuerdings Belege dafür gibt, dass eine frühe Menarche mit einem erhöhten Risiko für Adipositas [187] und für Brustkrebs einhergeht [253]. Zum Zeitpunkt der Manifestation zeigen Mädchen mit PA keine ovarielle Sekretion [165, 224] und keine polycystische Ovarien, eine Vergrößerung der Ovarien ist jedoch bereits nachweisbar [25, 38]. Als weitere Folge der PA kann eine funktionelle ovarielle Hyperandrogenämie eintreten, eine Form des polycystischen Ovar-Syndroms, und soll bis zu 45% der Jugendlichen mit ehemaliger PA betreffen [132, 135, 138, 140]. Jedoch scheint in der vorliegenden Untersuchung die Inzidenz des PCOS, gemessen an den Zyklusstörungen bei Hyperandrogenämie, geringer zu sein, und beträgt höchstens 30%. Allerdings ist hier der Beobachtungszeitpunkt zu früh gewählt, in einem Alter, welches üblicherweise noch keinen stabilen Zyklus erwarten lässt [6]. Ein retrospektiver Zusammenhang zwischen sekundärer ovarieller Störung und DHEAS-Spiegeln bei Manifestation lässt sich in der vorliegenden Studie nicht erkennen, wie auch in einer anderen Untersuchung nicht [119, 138]. Aber in einer spanischen Untersuchung korrelieren hohe initiale DHEAS- und Androstendion- Spiegel mit später erhobenen Parametern der funktionellen ovariellen Hyperandrogenämie [138, 140]. Experimentelle Daten belegen, dass eine prä- oder postnatale Androgen-Exposition zur Entwicklung eines Polycystischen Ovar-Syndroms führt [1, 81], weil es durch die Hyperandrogenämie selbst zur Störung der Feedback-Regulation, LH-Überstimulation und ovariellen Androgenbildung sowie Ausbildung zystischer Ovarien kommt. Diese Konstellation ist auch von Frauen mit Adrenogenitalem Syndrom bekannt [24]. Das Risiko, ein PCOS zu entwickeln, steigt bei Adipositas oder Stamm-betonter Fettverteilung an, sofern sie mit einer Insulinresistenz und Hyperinsulinämie einhergehen, da diese in der Genese des PCOS eine wesentliche Rolle spielen [132]. Die durch Hyperinsulinämie und IGFBP-1-Erniedrigung erhöhte IGF-I-Bioaktivität (s. Kapitel 6.2.) steigert nicht nur die NNR-Ansprechbarkeit, sondern zusätzlich auch die Sensitivität des Ovars gegenüber LH; dies bewirkt eine Thekazell-Stimulation und verstärkt die Hyperandrogenämie auf der ovariellen Ebene [2]. Diese Auswirkungen liessen sich auch in vivo durch Erhöhung der zirkulierenden IGF-I - Spiegel beobachten: Bei Frauen mit Laron-Syndrom, der Wachstumshomon-Resistenz, entstand unter Therapie mit IGF-I eine Hyperandrogenämie und führte zu polycystischen Ovarien [159]. Darüber hinaus weist die familiäre Häufung von erhöhten DHEAS-Spiegeln bei männlichen und weiblichen Angehörigen von Frauen mit PCOS auf einen kausalen genetischen Defekt hin, der aber bislang noch nicht eindeutig identifiziert wurde, weder in den Steroidsynthese-Genen, noch im Insulin-Rezeptor-Gen [94, 200, 201].

Eine Nachbetreuung der Patientinnen mit PA über den Pubertätsbeginn hinaus wird angeraten, weniger wegen des Wachstums, wohl aber wegen des Risikos des Hirsutismus und der gestörten Ovarfunktion. Dabei ist das

diagnostische und therapeutische Vorgehen bei Jugendlichen mit einer Anamnese der PA noch gar nicht geklärt. Es wird zwar empfohlen, Mädchen mit Prämaturer Adrenarche auf ihr erhöhtes Risiko, Hirsutismus, Zyklus- oder Fertilitätsstörungen zu entwickeln, hinzuweisen. Insbesondere seien die zu überwachen, die eine familiäre Belastung [200, 201], hohe Androgenspiegel [119, 138] oder eine Adipositas mit Hyperinsulinämie haben [23, 244, 321]. Obgleich Hirsutismus und PCOS so verbreitet sind, gibt es jedoch keine Evidenz dafür, welche Faktoren bei der einzelnen Patientin mit PA als Prädiktoren für die Entwicklung eines PCOS dienen können. Ferner gibt es auch keine Kriterien dafür, wann bei Mädchen oder Jugendlichen eine Therapie der Androgen-bedingten Wachstums- und Entwicklungsbeschleunigung indiziert ist. Aus der vorliegenden Studie und den zitierten Arbeiten geht nur klar hervor, dass bei typischer Prämaturer Adrenarche eine Therapie der Wachstumsbeschleunigung nicht erforderlich ist (vgl. Kapitel 1.6.4., [287]). Gleichfalls gibt es nur wenige Untersuchungen zur Therapie der postpubertären Störungen. Bei Hirsutismus und Oligomenorrhoe von Adolescentinnen wurde kürzlich die Wirksamkeit des Androgenrezeptorblockers Flutamid gezeigt [136], hingegen bei Insulinresistenz ist Metformin geeignet [11, 141, 143], oder auch eine Kombination beider Substanzen [142]. Diese Therapiestudien an Jugendlichen wurden bisher nur mit kleinen Zahlen und nicht kontrolliert durchgeführt. Auch gibt es noch keine prospektive Studien, die nach Prädiktoren des PCOS nach PA suchen. Somit sind weitere Untersuchungen dazu anzustreben.

7 Schlussfolgerungen und Hypothesen

Am zellbiologischen Modell und in klinischen Untersuchungen konnte die über IGF-I, -II und Insulin vermittelte Stimulation der NNR-Aktivität mit überwiegender Androgenbildung belegt werden. Vor der Pubertät signalisieren Insulin und die IGFs, gemeinsam mit Leptin, dem Hypothalamus und den steroidbildenden Organen die Körperzusammensetzung und erlauben somit die weitere Pubertätsentwicklung, die Adrenarche und die Gonadarche. Jenseits des Pubertätsbeginns gibt es jedoch keinen Anhalt, dass Leptin die adrenalen Androgene stimuliert. Diesen Befunden kommt im Rahmen der zunehmenden Adipositasprävalenz auch bei Kindern eine besondere Bedeutung zu. Der Einfluss von Leptin, IGFs und Insulin für die Hyperandrogenämie ist nun vor allem bei heranwachsenden Mädchen mit Adipositas zu klären, um Untergruppen der Übergewichtigen herauszufinden, die ein besonderes Risiko haben, ein PCOS zu entwickeln, und präventive Strategien aufzubauen sowie effiziente Therapieformen zu prüfen.

Die physiologische Reifung der NNR-Androgen-Sekretion ist der wissenschaftlichen Analyse nur schlecht zugänglich, da sie Spezies-spezifisch und an den intakten einzigartigen Aufbau der NNR gebunden ist. Ein hypophysär-hypothalamischer Androgen-bildender Faktor kommt nach derzeitigem Wissensstand für die physiologische Steuerung der Adrenarche nicht in Frage. Der physiologischen Adrenarche liegt offensichtlich ein sehr langsamer Wachstums- und Differenzierungsprozess der Reticularis-Zellen zugrunde, der sich über mehrere Jahre erstreckt. Dieser könnte in besonderer Weise von der Wirkung des IGF-I und -II abhängen. Die Bedeutung des IGF-II für die NNR-Tumorgenese wurde klar belegt, und wird angenommen für das NNR-Wachstum. Der Verlauf der IGF-Blutspiegel während von der Geburt bis zur Seneszenz ähnelt den Änderungen der NNR-Morphologie und suggeriert, dass sie sich gut als spezifische Wachstumsfaktoren der NNR eignen. Dazu kommt, dass ihr Typ 1-IGF-Rezeptor vorwiegend in der Zona Reticularis lokalisiert ist. Die IGF-I-Spiegel steigen bis zur Pubertät stetig an, während die IGF-II-Spiegel im Blut nach der Geburt einen Abfall zeigen, der mit der Involution der fetalen NNR zusammenfällt. Am Ende des 1. Lebensjahres nehmen IGF-I und II wieder zu bis auf ein Plateau im Jugendalter; dann sinken sie in der Seneszenz signifikant ab. Da IGF-II bei Kleinkindern eine schwache Korrelation mit der Fettmasse zeigt, und IGF-I das Längenwachstum signalisiert, könnten sie gut den Zustand des kindlichen Gedeihens an die NNR vermitteln. Daher wäre in morphologischen Arbeiten zu klären, wie die lokalen IGF-I- und -II-Konzentrationen in der NNR mit der Adrenarche und der Adrenopause in Zusammenhang stehen. Longitudinale biochemische Untersuchungen an gesunden Kindern sollten untersuchen, wie die NNR-Funktion von zirkulierenden IGF-Spiegeln abhängt.

Literaturverzeichnis

- 1 Abbott DH, Dumesic DA, Franks S: Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol* 2002;174:1-5.
- 2 Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, Hurwitz A, Roberts CT, LeRoith D, Rosenfeld R: Insulin-like growth factor I as an intraovarian regulator: basic and clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* 1991;626:161-168.
- 3 Albertson BD, Hobson WC, Burnett BS, Turner PT, Clark RV, Schiebinger RJ, Loriaux DL, Cutler GB, Jr.: Dissociation of cortisol and adrenal androgen secretion in the hypophysectomized, adrenocorticotropin-replaced chimpanzee. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:13-18.
- 4 Alesci S, Bornstein SR: Intraadrenal mechanisms of DHEA regulation: a hypothesis for adrenopause. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:75-82.
- 5 Anderson DC: The adrenal androgen-stimulating hormone does not exist. *Lancet* 1980;2:454-456.
- 6 Apter D: Development of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Ann N Y Acad Sci* 1997;816:9-21.
- 7 Apter D, Vihko R: Endocrine determinants of fertility: serum androgen concentrations during follow-up of adolescents into the third decade of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:970-974.
- 8 Arlt W, Allolio B: Dehydroepiandrosterone replacement therapy. *Current Opinion in Diabetes & Endocrinology* 2001;8:130-139.
- 9 Arlt W, Callies F, van Vlijmen JC, Koehler I, Reincke M, Bidlingmaier M, Huebler D, Oettel M, Ernst M, Schulte HM, Allolio B: Dehydroepiandrosterone replacement in women with adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 1999;341:1013-1020.
- 10 Arlt W, Martens J, Song M, Wang J, Miller W: Molecular evolution of adrenarche: Structural and functional analysis of P450c17 from four primate species. *Endocrinology* 2002;143:4665-4672.
- 11 Arslanian SA, Lewy V, Danadian K, Saad R: Metformin therapy in obese adolescents with polycystic ovary syndrome and impaired glucose tolerance: amelioration of exaggerated adrenal response to adrenocorticotropin with reduction of insulinemia/insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1555-1559.
- 12 Asuncion M, Calvo RM, San Millan JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF: A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2434-2438.
- 13 Attia N, Tamborlane WV, Heptulla R, Maggs D, Grozman A, Sherwin RS, Caprio S: The metabolic syndrome and insulin-like growth factor I regulation in adolescent obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1467-1471.
- 14 Azziz R, Black V, Hines GA, Fox LM, Boots LR: Adrenal androgen excess in the polycystic ovary syndrome: sensitivity and responsivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2317-2323.
- 15 Azziz R, Bradley EL, Jr., Potter HD, Boots LR: Adrenal androgen excess in women: lack of a role for 17-hydroxylase and 17,20-lyase dysregulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:400-405.
- 16 Azziz R, Dewailly D, Owerbach D: Clinical review 56: Nonclassic adrenal hyperplasia: current concepts. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:810-815.
- 17 Azziz R, Gay FL, Potter SR, Bradley E Jr, Boots LR: The effects of prolonged hypertestosteronemia on adrenocortical biosynthesis in oophorectomized women. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:1025-1030.
- 18 Azziz R, Wells G, Zacur HA, Acton RT: Abnormalities of 21-hydroxylase gene ratio and adrenal steroidogenesis in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to acute adrenal stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1327-1331.

- 19 Baird A, Kan KW, Solomon S: Role of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the regulation of steroid production by human fetal adrenal cells in culture. *J Endocrinol* 1983;97:357-367.
- 20 Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A: Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996;10:903-918.
- 21 Balducci R, Boscherini B, Mangiantini A, Morellini M, Toscano V: Isolated precocious pubarche: an approach. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:582-589.
- 22 Balducci R, Toscano V, Larizza D, Mangiantini A, Galasso C, Municchi G, Di Rito A, Picone S, Boscherini B: Effects of long-term growth hormone therapy on adrenal steroidogenesis in Turner syndrome. *Horm Res* 1998;49:210-215.
- 23 Banerjee S, Raghavan S, Wasserman EJ, Linder BL, Saenger P, DiMartino-Nardi J: Hormonal findings in African-American and Caribbean Hispanic girls with premature adrenarche: implications for polycystic ovarian syndrome. *Pediatrics* 1998;102:E36.
- 24 Barnes RB, Rosenfield RL, Ehrmann DA, Cara JF, Cuttler L, Levitsky LL, Rosenthal IM: Ovarian hyperandrogenism as a result of congenital adrenal virilizing disorders: evidence for perinatal masculinization of neuroendocrine function in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1328-1333.
- 25 Battaglia C, Regnani G, Mancini F, Iughetti L, Bernasconi S, Volpe A, Flamigni C, Venturoli S: Isolated premature pubarche: ultrasonographic and color Doppler analysis--a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3148-3154.
- 26 Baulieu EE: Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth? *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3147-3151.
- 27 Baxter R: Physiological roles of IGF binding proteins.; in: Spencer E (ed): *Modern concepts of Insulin-Like Growth Factors*. New York, 1991, pp 371-380.
- 28 Bayley HS, Pinneau S: Tables for predicting adult height from skeletal age: revised for use with Greulich-Pyle hand standard. 1952.
- 29 Bernasconi S, Petraglia F, Iughetti L, Marcellini C, Lamborghini A, Facchinetti F, Genazzani AR: Impaired beta-endorphin response to human corticotropin-releasing hormone in obese children. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1988;119:7-10.
- 30 Biason-Lauber A, Leiberman E, Zachmann M: A single amino acid substitution in the putative redox partner-binding site of P450c17 as cause of isolated 17,20-lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3807-3812.
- 31 Biason-Lauber A, Zachmann M, Schoenle EJ: Effect of leptin on CYP17 enzymatic activities in human adrenal cells: new insight in the onset of adrenarche. *Endocrinology* 2000;141:1446-1454.
- 32 Bicknell AB: Identification of the adrenal protease that cleaves pro-gamma-MSH: the dawning of a new era in adrenal physiology? *J Endocrinol* 2002;172:405-410.
- 33 Blum W, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel N, Müller J, Attanasio A, Kiess W, Rascher W: Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2904-2910.
- 34 Boot AM, Bouquet J, de Ridder MA, Krenning EP, De Muinck K: Determinants of body composition measured by dual-energy X-ray absorptiometry in Dutch children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 1997;66:232-238.
- 35 Bornstein SR, Chrousos GP: Clinical review 104: Adrenocorticotropin (ACTH)- and non-ACTH-mediated regulation of the adrenal cortex: neural and immune inputs. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1729-1736.
- 36 Bornstein SR, Vaudry H: Paracrine and neuroendocrine regulation of the adrenal gland--basic and clinical aspects. *Horm Metab Res* 1998;30:292-296.
- 37 Bray G, Dahms W, Swerdloss R, Fiser R, Atkinson R, Carrel X: The Prader-Willi syndrome. A study of 40 patients and a review of the literature. *Medicine* 1983;62:59-80.

- 38 Bridges NA, Cooke A, Healy MJ, Hindmarsh PC, Brook CG: Ovaries in sexual precocity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42:135-140.
- 39 Bucsky P, Parlowsky T: Nebennierenrinden-Karzinome; in: Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (ed): *Maligne endokrine Tumoren im Kindes- und Jugendalter* Lübeck, Medizinische Universität, 1999, pp 31-34.
- 40 Cailleau J, Vermeire S, Verhoeven G: Independent control of the production of insulin-like growth factor I and its binding protein by cultured testicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 1990;69:79-89.
- 41 Camacho-Hubner C, Busby WH, Jr., McCusker RH, Wright G, Clemmons DR: Identification of the forms of insulin-like growth factor-binding proteins produced by human fibroblasts and the mechanisms that regulate their secretion. *J Biol Chem* 1992;267:11949-11956.
- 42 Chakravorty A, Mesiano S, Jaffe RB: Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3732-3738.
- 43 Chapman IM, Wittert GA, Norman RJ: Circulating leptin concentrations in polycystic ovary syndrome: relation to anthropometric and metabolic parameters. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:175-181.
- 44 Chatelain PG, Van Wyk J, Copeland KC, Blethen SL, Underwood LE: Effect of in vitro action of serum proteases or exposure to acid on measurable immunoreactive somatomedin-C in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:376-383.
- 45 Cherradi N, Capponi AM, Gaillard RC, Pralong FP: Decreased expression of steroidogenic acute regulatory protein: a novel mechanism participating in the leptin-induced inhibition of glucocorticoid biosynthesis. *Endocrinology* 2001;142:3302-3308.
- 46 Cicognani A, Cacciari E, Tacconi M, Pascucci MG, Tonioli S, Pirazzoli P, Balsamo A: Effect of gonadectomy on growth hormone, IGF-I and sex steroids in children with complete and incomplete androgen insensitivity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1989;121:777-783.
- 47 Cizza G, Dorn LD, Lotsikas A, Sereika S, Rotenstein D, Chrousos GP: Circulating plasma leptin and IGF-1 levels in girls with premature adrenarche: potential implications of a preliminary study. *Horm Metab Res* 2001;33:138-143.
- 48 Clarke D, Fearon U, Cunningham SK, McKenna TJ: The steroidogenic effects of beta-endorphin and joining peptide: a potential role in the modulation of adrenal androgen production. *J Endocrinol* 1996;151:301-307.
- 49 Cohen HN, Wallace AM, Beastall GH, Fogelman I, Thomson JA: Clinical value of adrenal androgen measurement in the diagnosis of delayed puberty. *Lancet* 1981;1:689-692.
- 50 Conley AJ, Bird IM: The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod* 1997;56:789-799.
- 51 Copeland KC, Johnson DM, Kuehl TJ, Castracane VD: Estrogen stimulates growth hormone and somatomedin-C in castrate and intact female baboons. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:698-703.
- 52 Couch RM, Muller J, Winter JS: Regulation of the activities of 17-hydroxylase and 17,20-desmolase in the human adrenal cortex: kinetic analysis and inhibition by endogenous steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:613-618.
- 53 Coulter CL, Goldsmith PC, Mesiano S, Voytek CC, Martin MC, Han VK, Jaffe RB: Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: I. Role of insulin-like growth factors (IGFs), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in growth regulation. *Endocrinology* 1996;137:4487-4498.
- 54 Coulter CL, Jaffe RB: Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2

- (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 1998;139:5144-5150.
- 55 Cunliffe WJ, Gould DJ: Prevalence of facial acne vulgaris in late adolescence and in adults. *Br Med J* 1979;1:1109-1110.
 - 56 Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M: High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1570-1574.
 - 57 Danker-Hopfe H, Delibalta K: Menarcheal age of Turkish girls in Bremen. *Anthropol Anz* 1990;48:1-14.
 - 58 Dardis A, Saraco N, Rivarola MA, Belgorosky A: Decrease in the expression of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in human adrenal tissue during prepuberty and early puberty: implications for the mechanism of adrenarche. *Pediatr Res* 1999;45:384-388.
 - 59 De Peretti E, Forest MG: Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:572-577.
 - 60 De Pergola G, Giagulli VA, Garruti G, Cospite MR, Giorgino F, Cignarelli M, Giorgino R: Low dehydroepiandrosterone circulating levels in premenopausal obese women with very high body mass index. *Metabolism* 1991;40:187-190.
 - 61 De Simone M, Farello G, Palumbo M, Gentile T, Ciuffreda M, Olioso P, Cinque M, De Matteis F: Growth charts, growth velocity and bone development in childhood obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:851-857.
 - 62 Delemarre-Van De Waal HA, van Coeverden SC, Rotteveel J: Hormonal determinants of pubertal growth. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 Suppl 6:1521-1526.
 - 63 Deschamps I, Giron B, Lestradet H: Blood Glucose, Insulin, and Free Fatty Acid Levels During Oral Glucose Tolerance Tests in 158 Obese Children. *Diabetes* 1977;26:89-93.
 - 64 Deslypere JP, Verdonck L, Vermeulen A: Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:564-570.
 - 65 Dewailly D: Definition and significance of polycystic ovaries. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997;11:349-368.
 - 66 Dhom G: The prepuberal and puberal growth of the adrenal (adrenarche). *Beitr Pathol* 1973;150:357-377.
 - 67 Dickerman Z, Grant DR, Faiman C, Winter JS: Intraadrenal steroid concentrations in man: zonal differences and developmental changes. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:1031-1036.
 - 68 DiMartino-Nardi J: Premature adrenarche: findings in prepubertal African-American and Caribbean-Hispanic girls. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:67-72.
 - 69 DiMartino-Nardi J: Pre- and postpuberal findings in premature adrenarche. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13 Suppl 5:1265-1269.
 - 70 Ducharme JR, Forest MG, De Peretti E, Sempe M, Collu R, Bertrand J: Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:468-476.
 - 71 Dunaif A, Graf M, Mandeli J, Laumas V, Dobrjansky A: Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:499-507.
 - 72 Dunaif A, Segal KR, Futterweit W, Dobrjansky A: Profound peripheral insulin resistance, independent of obesity, in polycystic ovary syndrome. *Diabetes* 1989;38:1165-1174.
 - 73 Eggens U, Bahr V, Oelkers W, Li CH: Effects of beta-lipotropin, beta-endorphin, gamma 2-melanotropin and corticotropin on steroid production by isolated human adrenocortical cells. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:779-783.
 - 74 Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP: Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 1998;19:101-143.

- 75 Ehrmann DA, Barnes RB, Rosenfield RL: Polycystic ovary syndrome as a form of functional ovarian hyperandrogenism due to dysregulation of androgen secretion. *Endocr Rev* 1995;16:322-353.
- 76 Eiholzer U, l'Allemand D, Schlumpf M, Torresani T, Girard J: Carbohydrate metabolism is not impaired after 3 years of growth hormone therapy in children with Prader-Willi syndrome. *Horm Res*, in press 2003.
- 77 Eiholzer U, Bachmann S, l'Allemand D: Is there a growth hormone deficiency in PWS ? Six arguments to support the presence of a hypothalamic GHD in PWS. *Horm Res* 2000;53 (Suppl.3):44-52.
- 78 Eiholzer U, l'Allemand D: Growth hormone normalises height, prediction of final height and hand length in children with Prader-Willi syndrome after four years of therapy. *Horm Res* 2000;53:185-192.
- 79 Eiholzer U, l'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Ellis K: Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long-term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* 2000;53:200-206.
- 80 Eiholzer U, Stutz K, Weinmann C, Torresani T, Molinari L, Prader A: Low insulin, IGF-I and IGFBP-3 levels in children with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 1998;157:890-893.
- 81 Eisner JR, Barnett MA, Dumesic DA, Abbott DH: Ovarian hyperandrogenism in adult female rhesus monkeys exposed to prenatal androgen excess. *Fertil Steril* 2002;77:167-172.
- 82 Ellis KJ: Body composition of a young, multiethnic, male population. *Am J Clin Nutr* 1997;66:1323-1331.
- 83 Ellis KJ, Abrams SA, Wong WW: Body composition of a young, multiethnic female population. *Am J Clin Nutr* 1997;65:724-731.
- 84 Endoh A, Kristiansen SB, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ: The zona reticularis is the site of biosynthesis of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate in the adult human adrenal cortex resulting from its low expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3558-3565.
- 85 Falorni A, G Galmacci, V Bini, F Faraoni, D Molinari, G Cabiati, M Sanasi, F Celi, G Di Stefano, MG Berioli, G Contessa, ML Bacosi: Using obese-specific charts of height and height velocity for assessment of growth in obese children and adolescents during weight excess reduction. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:181-188.
- 86 Fearon U, Clarke D, McKenna TJ, Cunningham SK: Intra-adrenal factors are not involved in the differential control of cortisol and adrenal androgens in human adrenals. *Eur J Endocrinol* 1998;138:567-573.
- 87 Ferry RJ, Jr., Cerri RW, Cohen P: Insulin-like growth factor binding proteins: new proteins, new functions. *Horm Res* 1999;51:53-67.
- 88 Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttent F, Vexiau P, Couillin P, Pham-Huu-Trung MT, Villette JM, Raux-Demay MC, Galons H, .: Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:659-667.
- 89 Forest MG: [Plasma androgens and maturation of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in infants and children (author's transl)]. *Pediatr Padol Suppl* 1977;13-28.
- 90 Forest MG: Steroidhormone; in: Hesch R D (ed): Band 4: Endokrinologie, Teil A München, Urban & Schwarzenberg, 1989, pp 74-95.
- 91 Forest MG, De Peretti E, David M, Sempe M: [Does adrenarche really play a determining role in pubertal development? A study of the dissociations between adrenarche and gonadarche. The failure of dehydroepiandrosterone sulfate treatment in delayed adrenarche]. *Ann Endocrinol (Paris)* 1982;43:465-495.
- 92 Fottner C, Engelhardt D, Elmlinger MW, Weber MM: Identification and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression and secretion by adult human adrenocortical cells: differential regulation by IGFs and adrenocorticotropin. *J Endocrinol* 2001;168:465-474.
- 93 Fottner C, Engelhardt D, Weber MM: Regulation of steroidogenesis by insulin-like growth factors (IGFs) in adult human adrenocortical cells: IGF-I and, more potently, IGF-II preferentially enhance androgen

- biosynthesis through interaction with the IGF-I receptor and IGF-binding proteins. *J Endocrinol* 1998;158:409-417.
- 94 Franks S: The 17 alpha-hydroxylase/17,20 lyase gene (CYP17) and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:135-136.
- 95 Friess E, Schifflholz T, Steckler T, Steiger A: Dehydroepiandrosterone--a neurosteroid. *Eur J Clin Invest* 2000;30 Suppl 3:46-50.
- 96 Frisch RE: A method of prediction of age of menarche from height and weight at ages 9 through 13 years. *Pediatrics* 1974;53:384-390.
- 97 Gasser T, Muller HG, Kohler W, Prader A, Largo R, Molinari L: An analysis of the mid-growth and adolescent spurts of height based on acceleration. *Ann Hum Biol* 1985;12:129-148.
- 98 Gell JS, Atkins B, Margraf L, Mason JI, Sasano H, Rainey WE, Carr BR: Adrenarche is associated with decreased 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in the adrenal reticularis. *Endocr Res* 1996;22:723-728.
- 99 Gell JS, Carr BR, Sasano H, Atkins B, Margraf L, Mason JI, Rainey WE: Adrenarche results from development of a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase-deficient adrenal reticularis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3695-3701.
- 100 Geller DH, Auchus RJ, Miller WL: P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome b5. *Mol Endocrinol* 1999;13:167-175.
- 101 Genazzani AR, Facchinetti F, Petraglia F, Pintor C, Bagnoli F, Puggioni R, Corda R: Correlations between plasma levels of opioid peptides and adrenal androgens in prepuberty and puberty. *J Steroid Biochem* 1983;19:891-895.
- 102 Genazzani AR, Pintor C, Corda R: Plasma levels of gonadotropins, prolactin, thyroxine, and adrenal and gonadal steroids in obese prepubertal girls. *J Clin Endocrinol Metab* 1978;47:974-979.
- 103 Genazzani A, Pintor C, Facchinetti F, Carboni G, Pelosi U, Corda R: Adrenal and Gonadal Steroids in Girls during Sexual Maturation. *Clin Endocrinol* 1978;8:15-25.
- 104 Ghizzoni L, Mastorakos G, Vottero A: Adrenal hyperandrogenism in children. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4431-4435.
- 105 Ghizzoni L, Mastorakos G, Ziveri M, Furlini M, Solazzi A, Vottero A, Bernasconi S: Interactions of leptin and thyrotropin 24-hour secretory profiles in short normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2065-2072.
- 106 Ghizzoni L, Milani S: The natural history of premature adrenarche. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13 Suppl 5:1247-1251.
- 107 Ghizzoni L, Virdis R, Ziveri M, Lamborghini A, Alberini A, Volta C, Bernasconi S: Adrenal steroid, cortisol, adrenocorticotropin, and beta-endorphin responses to human corticotropin-releasing hormone stimulation test in normal children and children with premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:875-880.
- 108 Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y: Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1444-1453.
- 109 Gillespie C, Read LC, Bagley CJ, Ballard FJ: Enhanced potency of truncated insulin-like growth factor-I (des(1-3)IGF-I) relative to IGF-I in lit/lit mice. *J Endocrinol* 1990;127:401-405.
- 110 Girgis R, Abrams SA, Castracane VD, Gunn SK, Ellis KJ, Copeland KC: Ethnic differences in androgens, IGF-I and body fat in healthy prepubertal girls. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:497-503.
- 111 Glasow A, Breidert M, Haidan A, Anderegg U, Kelly PA, Bornstein SR: Functional aspects of the effect of prolactin (PRL) on adrenal steroidogenesis and distribution of the PRL receptor in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3103-3111.

- 112 Glasow A, Haidan A, Hilbers U, Breidert M, Gillespie J, Scherbaum WA, Chrousos GP, Bornstein SR: Expression of Ob receptor in normal human adrenals: differential regulation of adrenocortical and adrenomedullary function by leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4459-4466.
- 113 Greulich W, Pyle S: *Radiographic Atlas of the Development of the Hand and Wrist*. Stanford CA, USA, Stanford University Press, 1959.
- 114 Grueters A, Korth-Schutz S: Longitudinal study of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in preterm and fullterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:314-320.
- 115 Grüters A: Growth and thyroid disorders.; in: Kelna C, Savage M O, Saenger P (eds): *Growth Disorders*. London, Chapman&Hall, 1998, pp 565-574.
- 116 Guercio G, Rivarola MA, Chaler E, Maceiras M, Belgorosky A: Relationship between the GH/IGF-I axis, insulin sensitivity, and adrenal androgens in normal prepubertal and pubertal boys. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1162-1169.
- 117 Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB: The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001;108:E92.
- 118 Han VK, D'Ercole AJ, Lund PK: Cellular localization of somatomedin (insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* 1987;236:193-197.
- 119 Hawkins LA, Chasalow FI, Blethen SL: The role of adrenocorticotropin testing in evaluating girls with premature adrenarche and hirsutism/oligomenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:248-253.
- 120 Helge H, Korth-Schutz S: [Clinical use of cyproterone acetate in children]. *Gynakologe* 1980;13:44-53.
- 121 Hesse V, Jaeger U, Vogel H, Kromeyer K, Zellner K, Bernhardt I, Hofmann A, Deichl A: Wachstumsdaten deutscher Kinder von der Geburt bis zu 18 Jahren. *Sozialpädiatrie* 1997;19:20-22.
- 122 Higuchi K, Nawata H, Maki T, Higashizima M, Kato K, Ibayashi H: Prolactin has a direct effect on adrenal androgen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:714-718.
- 123 Hill DJ, Clemmons DR, Wilson S, Han VK, Strain AJ, Milner RD: Immunological distribution of one form of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein and IGF peptides in human fetal tissues. *J Mol Endocrinol* 1989;2:31-38.
- 124 Hines GA, Azziz R: Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1017-1021.
- 125 Hines GA, Smith ER, Azziz R: Influence of insulin and testosterone on adrenocortical steroidogenesis in vitro: preliminary studies. *Fertil Steril* 2001;76:730-735.
- 126 Horn R, Geldszus R, Potter E, von zur MA, Brabant G: Radioimmunoassay for the detection of leptin in human serum. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104:454-458.
- 127 Hornsby PJ: Regulation of 21-hydroxylase activity by steroids in cultured bovine adrenocortical cells: possible significance for adrenocortical androgen synthesis. *Endocrinology* 1982;111:1092-1101.
- 128 Hornsby PJ: The Biosynthesis of DHEA by the Adrenal cortex and its Age-related Decline; in: Watson RW (ed): *Health Promotion and Aging*. Harward, NJ, Academic, 1998, pp 1-13.
- 129 Huber A: [Acceleration of menarchal age (observations from the western provinces of Austria) (author's transl)]. *Wien Klin Wochenschr* 1973;85:844-847.
- 130 Huq MS, Jespersen D, Pfaff M, Zucker IR, Kirschner MA: Concurrence of aldosterone, androgen, and cortisol secretion in adrenal venous effluents. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:230-238.
- 131 Ibanez L, Bonnin MR, Zampolli M, Prat N, Alia PJ, Navarro MA: Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche. *Horm Res* 1995;44:51-56.
- 132 Ibanez L, DiMartino-Nardi J, Potau N, Saenger P: Premature adrenarche--normal variant or forerunner of adult disease? *Endocr Rev* 2000;21:671-696.

- 133 Ibanez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F: Corticotropin-releasing hormone as adrenal androgen secretagogue. *Pediatr Res* 1999;46:351-353.
- 134 Ibanez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F: Corticotropin-releasing hormone: a potent androgen secretagogue in girls with hyperandrogenism after precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4602-4606.
- 135 Ibanez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F: Adrenal hyperandrogenism in adolescent girls with a history of low birthweight and precocious pubarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:523-527.
- 136 Ibanez L, Potau N, Marcos MV, de Zegher F: Treatment of hirsutism, hyperandrogenism, oligomenorrhea, dyslipidemia, and hyperinsulinism in nonobese, adolescent girls: effect of flutamide. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3251-3255.
- 137 Ibanez L, Potau N, Ong K, Dunger DB, de Zegher F: Increased bone mineral density and serum leptin in non-obese girls with precocious pubarche: relation to low birthweight and hyperinsulinism. *Horm Res* 2000;54:192-197.
- 138 Ibanez L, Potau N, Virdis R, Zampolli M, Terzi C, Gussinye M, Carrascosa A, Vicens-Calvet E: Postpubertal outcome in girls diagnosed of premature pubarche during childhood: increased frequency of functional ovarian hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1599-1603.
- 139 Ibanez L, Potau N, Zampolli M, Rique S, Saenger P, Carrascosa A: Hyperinsulinemia and decreased insulin-like growth factor-binding protein-1 are common features in prepubertal and pubertal girls with a history of premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2283-2288.
- 140 Ibanez L, Potau N, Zampolli M, Street ME, Carrascosa A: Girls diagnosed with premature pubarche show an exaggerated ovarian androgen synthesis from the early stages of puberty: evidence from gonadotropin-releasing hormone agonist testing. *Fertil Steril* 1997;67:849-855.
- 141 Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Marcos MV, Rodriguez-Hierro F, de Zegher F: Sensitization to insulin induces ovulation in nonobese adolescents with anovulatory hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3595-3598.
- 142 Ibanez L, Valls C, Ferrer A, Ong K, Dunger DB, de Zegher F: Additive effects of insulin-sensitizing and anti-androgen treatment in young, nonobese women with hyperinsulinism, hyperandrogenism, dyslipidemia, and anovulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2870-2874.
- 143 Ibanez L, Valls C, Potau N, Marcos MV, de Zegher F: Sensitization to insulin in adolescent girls to normalize hirsutism, hyperandrogenism, oligomenorrhea, dyslipidemia, and hyperinsulinism after precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3526-3530.
- 144 Ibanez L, Virdis R, Potau N, Zampolli M, Ghizzoni L, Albisu MA, Carrascosa A, Bernasconi S, Vicens-Calvet E: Natural history of premature pubarche: an auxological study. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:254-257.
- 145 Ilvesmaki V, Blum WF, Voutilainen R: Insulin-like growth factor binding proteins in the human adrenal gland. *Mol Cell Endocrinol* 1993;97:71-79.
- 146 Ilvesmaki V, Blum WF, Voutilainen R: Insulin-like growth factor-II in human fetal adrenals: regulation by ACTH, protein kinase C and growth factors. *J Endocrinol* 1993;137:533-542.
- 147 Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R: Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:852-858.
- 148 Ilvesmaki V, Liu J, Heikkila P, Kahri AI, Voutilainen R: Expression of insulin-like growth factor binding protein 1-6 genes in adrenocortical tumors and pheochromocytomas. *Horm Metab Res* 1998;30:619-623.
- 149 Jabbar M, Pugliese M, Fort P, Recker B, Lifshitz F: Excess weight and precocious pubarche in children: alterations of the adrenocortical hormones. *J Am Coll Nutr* 1991;10:289-296.

- 150 Jakubowicz DJ, Beer NA, Beer RM, Nestler JE: Disparate effects of weight reduction by diet on serum dehydroepiandrosterone-sulfate levels in obese men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3373-3376.
- 151 Jansen M, van Schaik FM, Ricker AT, Bullock B, Woods DE, Gabbay KH, Nussbaum AL, Sussenbach JS, Van den Brande JL: Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature* 1983;306:609-611.
- 152 Jansen M, van Schaik FM, van Tol H, Van den Brande JL, Sussenbach JS: Nucleotide sequences of cDNAs encoding precursors of human insulin-like growth factor II (IGF-II) and an IGF-II variant. *FEBS Lett* 1985;179:243-246.
- 153 John ME, John MC, Ashley P, MacDonald RJ, Simpson ER, Waterman MR: Identification and characterization of cDNA clones specific for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5628-5632.
- 154 Kalies H, Lenz J, Von Kries R: Prevalence of overweight and obesity and trends in body mass index in German pre-school children, 1982-1997. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:1211-1217.
- 155 Kanety H, Karasik A, Klinger B, Silbergeld A, Laron Z: Long-term treatment of Laron type dwarfs with insulin-like growth factor-1 increases serum insulin-like growth factor-binding protein-3 in the absence of growth hormone activity. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;128:144-149.
- 156 Katagiri M, Kagawa N, Waterman MR: The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:343-347.
- 157 Kiess W, Blickenstaff GD, Sklar MM, Thomas CL, Nissley SP, Sahagian GG: Biochemical evidence that the type II insulin-like growth factor receptor is identical to the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem* 1988;263:9339-9344.
- 158 Kiss A: Gesundheit und Gesundheitsverhalten von Jugendlichen in Berlin unter besonderer Berücksichtigung der Ergebnisse von Schulentlassungsuntersuchungen 1994/5. Diskussionspapier. Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales, Berlin 1997;43-49.
- 159 Klinger B, Anin S, Silbergeld A, Eshet R, Laron Z: Development of hyperandrogenism during treatment with insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female patients with Laron syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:81-87.
- 160 Knochenhauer ES, Cortet-Rudelli C, Cunnigham RD, Conway-Myers BA, Dewailly D, Azziz R: Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:479-485.
- 161 Knochenhauer ES, Key TJ, Kahsar-Miller M, Waggoner W, Boots LR, Azziz R: Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3078-3082.
- 162 Knorr D, Bidlingmaier F, Holler W, Kuhnle U, Meiler B, Nachmann A: Is heterozygosity for the steroid 21-hydroxylase deficiency responsible for hirsutism, premature pubarche, early puberty, and precocious puberty in children? *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)* 1986;279:284-289.
- 163 Korth-Schütz S. Androgene im Kindesalter. 1981. Habilitationsschrift, Freie Universität, Berlin.
- 164 Korth-Schutz S, Grüters A: Serum Prolactin in normal and delayed male puberty. *Pediatr Res* 1978;12:1093.
- 165 Korth-Schutz S, Levine LS, New MI: Evidence for the adrenal source of androgens in precocious adrenarche. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1976;82:342-352.
- 166 Korth-Schutz S, Levine LS, New MI: Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:117-124.
- 167 Kramer RE, Buster JE, Andersen RN: Differential modulation of ACTH-stimulated cortisol and androstenedione secretion by insulin. *J Steroid Biochem* 1990;36:33-42.

- 168 Kristiansen SB, Endoh A, Casson PR, Buster JE, Hornsby PJ: Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids* 1997;62:258-265.
- 169 Kromeyer-Hauschild K, Zellner K, Jaeger U, Hoyer H: Prevalence of overweight and obesity among school children in Jena (Germany). *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1143-1150.
- 170 Krook A, Humphreys P, O'Rahilly S: Molecular Mechanisms of insulin resistance.; in: Thakker R (ed): *Molecular Genetics of Endocrine Disorders* London, Chapman&Hall, 1997, pp 131-156.
- 171 l'Allemand D, Eiholzer U, Schlumpf M, Torresani T, Girard J: Prader-Willi Syndrome (PWS): Glucose Homeostasis and Insulin Secretion Remain Unchanged after 3 Years of Treatment with hGh as an Effect of Improved Body Composition. *Horm Res* 2000;53 (suppl 2):131.
- 172 l'Allemand D, Eiholzer U, Rousson V, Girard J, Blum WF, Torresani T, Gasser T: Increased adrenal androgens in Prader-Willi syndrome (PWS) are associated with insulin, IGF-I and leptin, but not with measures of obesity. *Horm Res* 2002;58:215-222.
- 173 l'Allemand D, Grütters A, Burger W, Kaethner T, Schnabel D, Helge H, Weber B: Role of androstenediol-glucuronide determination in children with premature pubarche. *Hormone Research* 1990;33:143.
- 174 l'Allemand D, Venz S, Westphal S, Grütters A: MRI reveals adrenal nodules and hyperplasia in a subset of patients with premature adrenarche. *Horm Res* 1996;46:88.
- 175 l'Allemand D: Regulation und Bedeutung adrenaler Androgene.; in: Alolio B, et al. (eds): *Nebenniere und Stress*. Stuttgart, Schattauer, 1995, pp 89-100.
- 176 l'Allemand D, Biason-Lauber A: Intra-adrenal regulation of androgen synthesis. *Eur J Clin Invest* 2000;30 Suppl 3:28-33.
- 177 l'Allemand D, Eiholzer U, Schlumpf M, Steinert H, Riesen W: Cardiovascular risk factors improve during 3 years of growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 2000;159:835-842.
- 178 l'Allemand D, Keller E, Hoepfner W, Serban A, Morel Y, Gruters A: Nonclassical adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase-deficiency: does genotyping predict the clinical manifestation? *Endocr Res* 1996;22:735-739.
- 179 l'Allemand D, Penhoat A, Blum W, Saez JM: Is there a local IGF-system in human adrenocortical cells? *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:169-173.
- 180 l'Allemand D, Penhoat A, Lebrethon MC, Ardevol R, Baehr V, Oelkers W, Saez JM: Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3892-3897.
- 181 l'Allemand D, Schmidt S, Rousson V, Brabant G, Gasser T, Gruters A: Associations between body mass, leptin, IGF-I and circulating adrenal androgens in children with obesity and premature adrenarche. *Eur J Endocrinol* 2002;146:537-543.
- 182 l'Allemand D, Tardy V, Gruters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y: How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassic form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4562-4567.
- 183 l'Allemand D, Westphal S, Grütters A: Longitudinale Beobachtung von 50 Kindern mit Prämaturer Adrenarche und Hirsutismus. *Monatsschr Kinderheilk* 1995;143:484.
- 184 Labrie F: Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 1991;78:C113-C118.
- 185 Labrie F, Belanger A, Cusan L, Candas B: Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: intracrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2403-2409.
- 186 Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Simard J: DHEA and its transformation into androgens and estrogens in peripheral target tissues: intracrinology. *Front Neuroendocrinol* 2001;22:185-212.

- 187 Laitinen J, Power C, Jarvelin MR: Family social class, maternal body mass index, childhood body mass index, and age at menarche as predictors of adult obesity. *Am J Clin Nutr* 2001;74:287-294.
- 188 Lajic S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanche H, Bellanne-Chantelot C, Wedell A: Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2824-2829.
- 189 Langlois D, Hinsch KD, Saez JM, Begeot M: Stimulatory effect of insulin and insulin-like growth factor I on Gi proteins and angiotensin-II-induced phosphoinositide breakdown in cultured bovine adrenal cells. *Endocrinology* 1990;126:1867-1872.
- 190 Langnase K, Mast M, Muller MJ: Social class differences in overweight of prepubertal children in northwest Germany. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:566-572.
- 191 Lanzone A, Guido M, Ciampelli M, Fulghesu AM, Pavone V, Proto C, Caruso A, Mancuso S: Evidence of a disturbance of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in polycystic ovary syndrome: effect of naloxone. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996;45:73-77.
- 192 Lashansky G, Saenger P, Fishman K, Gautier T, Mayes D, Berg G, Martino-Nardi J, Reiter E: Normative data for adrenal steroidogenesis in a healthy pediatric population: age- and sex-related changes after adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:674-686.
- 193 Lautala P, Akerblöm H, Viikari J, Louhivouri K, Uhari M, Dahlström S, Dahl M, Lähde P, Pesonen E, Pietikäinen M, Suoninen P, Knip M: Atherosclerosis precursors in Finnish children and adolescents. VII. Serum immunoreactive insulin. *Acta Paediatr Scand* 1985;318 (suppl):127-133.
- 194 Lavalley B, Provost PR, Kahwash Z, Nestler JE, Belanger A: Effect of insulin on serum levels of dehydroepiandrosterone metabolites in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:93-100.
- 195 Lazar L, Kauli R, Bruchis C, Nordenberg J, Galatzer A, Pertzlan A: Early polycystic ovary-like syndrome in girls with central precocious puberty and exaggerated adrenal response. *Eur J Endocrinol* 1995;133:403-406.
- 196 Le Roith D: Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997;336:633-640.
- 197 Lebrethon MC, Jaillard C, Defayes G, Begeot M, Saez JM: Human cultured adrenal fasciculata-reticularis cells are targets for angiotensin-II: effects on cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase, and 3 beta-hydroxysteroid-dehydrogenase messenger ribonucleic acid and proteins and on steroidogenic responsiveness to corticotropin and angiotensin-II. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1212-1219.
- 198 Lebrethon MC, Jaillard C, Naville D, Begeot M, Saez JM: Effects of transforming growth factor-beta 1 on human adrenocortical fasciculata-reticularis cell differentiated functions. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1033-1039.
- 199 Lebrethon MC, Naville D, Begeot M, Saez JM: Regulation of corticotropin receptor number and messenger RNA in cultured human adrenocortical cells by corticotropin and angiotensin II. *J Clin Invest* 1994;93:1828-1833.
- 200 Legro RS, Bentley-Lewis R, Driscoll D, Wang SC, Dunaif A: Insulin resistance in the sisters of women with polycystic ovary syndrome: association with hyperandrogenemia rather than menstrual irregularity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2128-2133.
- 201 Legro RS, Kunselman AR, Demers L, Wang SC, Bentley-Lewis R, Dunaif A: Elevated dehydroepiandrosterone sulfate levels as the reproductive phenotype in the brothers of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2134-2138.
- 202 Leiter EH, Chapman HD: Obesity-induced diabetes (diabesity) in C57BL/KsJ mice produces aberrant trans-regulation of sex steroid sulfotransferase genes. *J Clin Invest* 1994;93:2007-2013.
- 203 Lejeune-Lenain C, Bosson D, Wolter R, Copinschi G, Franckson JR: Evolution of the delta 4-adrenal androgens responsiveness in childhood during insulin test. *Helv Paediatr Acta* 1984;39:331-340.

- 204 LeRoith D, Sampson PC, Roberts CT, Jr.: How does the mitogenic insulin-like growth factor I receptor differ from the metabolic insulin receptor? *Horm Res* 1994;41 Suppl 2:74-78.
- 205 Likitmaskul S, Cowell CT, Donaghue K, Kreutzmann DJ, Howard NJ, Blades B, Silink M: 'Exaggerated adrenarche' in children presenting with premature adrenarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995;42:265-272.
- 206 Lin CJ, Mendonca BB, Lucon AM, Guazzelli IC, Nicolau W, Villares SM: Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal and pathologic human adrenocortical tissues--an analysis by quantitative polymerase chain reaction technique. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2671-2676.
- 207 Lindgren AC, Hagenas L, Ritzen EM: Growth hormone treatment of children with Prader-Willi syndrome: effects on glucose and insulin homeostasis. *Horm Res* 1999;51:157-161.
- 208 Lindgren A, Hagenäs L, Müller J, Blichfeldt S, Rosenfeld R, Brismar T, Ritzen E: Growth hormone treatment of children with Prader-Willi syndrome affects linear growth and body composition favourably. *Acta Paediatr* 1998;87:28-31.
- 209 Liou LS, Kay R: Adrenocortical carcinoma in children. Review and recent innovations. *Urol Clin North Am* 2000;27:403-421.
- 210 Lippe B, Kaplan S, Golden M, Hendricks S, Scott M: Carbohydrated Tolerance and Insulin Receptor Binding in Children with Hypopituitarism: Responses after Acute and Chronic Human Growth Hormone Administration. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:507-513.
- 211 Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Ilvesmaki V, Voutilainen R: H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:492-496.
- 212 Louveau I, Penhoat A, Saez JM: Regulation of IGF-I receptors by corticotropin and angiotensin-II in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;163:32-36.
- 213 Lucky AW, Rosenfield RL, McGuire J, Rudy S, Helke J: Adrenal androgen hyperresponsiveness to adrenocorticotropin in women with acne and/or hirsutism: adrenal enzyme defects and exaggerated adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:840-848.
- 214 Lutfallah C, Wang W, Mason JI, Chang YT, Haider A, Rich B, Castro-Magana M, Copeland KC, David R, Pang S: Newly proposed hormonal criteria via genotypic proof for type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2611-2622.
- 215 Luu T, V, Lachance Y, Labrie C, Leblanc G, Thomas JL, Strickler RC, Labrie F: Full length cDNA structure and deduced amino acid sequence of human 3 beta-hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase. *Mol Endocrinol* 1989;3:1310-1312.
- 216 Maccario M, Mazza E, Ramunni J, Oleandri SE, Savio P, Grotoli S, Rossetto R, Procopio M, Gauna C, Ghigo E: Relationships between dehydroepiandrosterone-sulphate and anthropometric, metabolic and hormonal variables in a large cohort of obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;50:595-600.
- 217 Malendowicz LK, Nussdorfer GG: Sex differences in adrenocortical structure and function: 29. Morphometric and functional studies on the effects of gonadectomy and gonadal-hormone replacement on the hamster adrenal cortex. *Acta Anat (Basel)* 1992;145:68-72.
- 218 Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD: A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1066-1070.
- 219 Mapes S, Corbin CJ, Tarantal A, Conley A: The primate adrenal zona reticularis is defined by expression of cytochrome b5, 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450 (P450c17) and NADPH-cytochrome P450 reductase (reductase) but not 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-4 isomerase (3beta-HSD). *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3382-3385.
- 220 Marshall JD, Hazlett CB, Spady DW, Conger PR, Quinney HA: Validity of convenient indicators of obesity. *Hum Biol* 1991;63:137-153.

- 221 Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F: Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta- hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol Cell Endocrinol* 1994;104:103-111.
- 222 Martel C, Rheaume E, Takahashi M, Trudel C, Couet J, Luu-The V, Simard J, Labrie F: Distribution of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and activity in rat and human tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:597-603.
- 223 Martikainen H, Salmela P, Nuojua-Huttunen S, Perala J, Leinonen S, Knip M, Ruokonen A: Insulin-like growth factors and their binding proteins in the venous effluents of ovary and adrenal gland in severely hyperandrogenic women. *Hum Reprod* 1997;12:446-448.
- 224 Mathew RP, Najjar JL, Lorenz RA, Mayes DE, Russell WE: Premature pubarche in girls is associated with functional adrenal but not ovarian hyperandrogenism. *J Pediatr* 2002;141:91-98.
- 225 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
- 226 Mesiano S, Coulter CL, Jaffe RB: Localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage, cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase/17, 20-lyase, and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in human and rhesus monkey fetal adrenal glands: reappraisal of functional zonation. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1184-1189.
- 227 Mesiano S, Jaffe RB: Interaction of insulin-like growth factor-II and estradiol directs steroidogenesis in the human fetal adrenal toward dehydroepiandrosterone sulfate production. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:754-758.
- 228 Mesiano S, Mellon SH, Jaffe RB: Mitogenic action, regulation, and localization of insulin-like growth factors in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:968-976.
- 229 Michl P, Engelhardt D, Oberneder R, Weber MM: Growth hormone has no direct effect on human adrenal steroid and insulin-like growth factor-binding protein secretion. *Endocr Res* 1999;25:281-293.
- 230 Miller WL: Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev* 1988;9:295-318.
- 231 Molinari L, Largo RH, Prader A: Analysis of the growth spurt at age seven (mid-growth spurt). *Helv Paediatr Acta* 1980;35:325-334.
- 232 Moran C, Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Fruzzetti F, Ibanez L, Knochenhauer ES, Marcondes JA, Mendonca BB, Pignatelli D, Pugeat M, Rohmer V, Speiser PW, Witchel SF: 21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1468-1474.
- 233 Morris AH, Reiter EO, Geffner ME, Lippe BM, Itami RM, Mayes DM: Absence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia in patients with precocious adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:709-715.
- 234 Naseeruddin SA, Hornsby PJ: Regulation of 11 beta- and 17 alpha-hydroxylases in cultured bovine adrenocortical cells: 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, insulin-like growth factor-I, and activators of protein kinase C. *Endocrinology* 1990;127:1673-1681.
- 235 Naville D, Chatelain PG, Avallet O, Saez JM: Control of production of insulin-like growth factor I by pig Leydig and Sertoli cells cultured alone or together. *Cell-cell interactions. Mol Cell Endocrinol* 1990;70:217-224.
- 236 Nestler JE: Regulation of human dehydroepiandrosterone metabolism by insulin. *Ann N Y Acad Sci* 1995;774:73-81.
- 237 Nestler JE, Clore JN, Blackard WG: Metabolism and actions of dehydroepiandrosterone in humans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40:599-605.
- 238 New MI: Diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia. *Annu Rev Med* 1998;49:311-328.

- 239 New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Pang S, Levine LS: Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:320-326.
- 240 Nye EJ, Bornstein SR, Grice JE, Tauchnitz R, Hockings GI, Strakosch CR, Jackson RV, Torpy DJ: Interactions between the stimulated hypothalamic-pituitary-adrenal axis and leptin in humans. *J Neuroendocrinol* 2000;12:141-145.
- 241 Oberfield SE, Mayes DM, Levine LS: Adrenal steroidogenic function in a black and Hispanic population with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:76-82.
- 242 Oelkers W: Dehydroepiandrosterone for adrenal insufficiency. *N Engl J Med* 1999;341:1073-1074.
- 243 Ong K, Kratzsch J, Kiess W, Dunger D: Circulating IGF-I levels in childhood are related to both current body composition and early postnatal growth rate. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1041-1044.
- 244 Oppenheimer E, Linder B, DiMartino-Nardi J: Decreased insulin sensitivity in prepubertal girls with premature adrenarche and acanthosis nigricans. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:614-618.
- 245 Ostlere LS, Rumsby G, Holownia P, Jacobs HS, Rustin MH, Honour JW: Carrier status for steroid 21-hydroxylase deficiency is only one factor in the variable phenotype of acne. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:209-215.
- 246 Palmert MR, Radovick S, Boepple PA: Leptin levels in children with central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2260-2265.
- 247 Pang SY, Lerner AJ, Stoner E, Levine LS, Oberfield SE, Engel I, New MI: Late-onset adrenal steroid 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency. I. A cause of hirsutism in pubertal and postpubertal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:428-439.
- 248 Parker CR, Jr., Mixon RL, Brissie RM, Grizzle WE: Aging alters zonation in the adrenal cortex of men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3898-3901.
- 249 Parker CR, Jr., Stankovic AM, Golland RS: Corticotropin-releasing hormone stimulates steroidogenesis in cultured human adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1999;155:19-25.
- 250 Parker L, Lifrak E, Shively J, Lee T, Kaplan B, Walker P, Calaycay J, Florsheim W, Soon-Shiong P: Human adrenal gland cortical androgen-stimulating hormone (CASH) is identical with a portion of the joining peptide of pituitary pro-opiomelanocortin (POMC). 71st Annual Meeting of the Endocrine Society Seattle WA June 21-24, 1989 :299.
- 251 Parker LN: Adrenal Androgens. San Diego, USA, Academic Press, 1989.
- 252 Pasquali R, Casimirri F: The impact of obesity on hyperandrogenism and polycystic ovary syndrome in premenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:1-16.
- 253 Peeters PH, Verbeek AL, Krol A, Matthyssen MM, de Waard F: Age at menarche and breast cancer risk in nulliparous women. *Breast Cancer Res Treat* 1995;33:55-61.
- 254 Pelz L: Menarcheal age in East German girls. *Acta Paediatr* 1992;81:946-947.
- 255 Penhoat A, Chatelain PG, Jaillard C, Saez JM: Characterization of insulin-like growth factor I and insulin receptors on cultured bovine adrenal fasciculata cells. Role of these peptides on adrenal cell function. *Endocrinology* 1988;122:2518-2526.
- 256 Penhoat A, Jaillard C, Saez JM: Synergistic effects of corticotropin and insulin-like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:355-359.
- 257 Penhoat A, Leduque P, Jaillard C, Chatelain PG, Dubois PM, Saez JM: ACTH and angiotensin II regulation of insulin-like growth factor-I and its binding proteins in cultured bovine adrenal cells. *J Mol Endocrinol* 1991;7:223-232.
- 258 Penhoat A, Ouali R, Viard I, Langlois D, Saez JM: Regulation of primary response and specific genes in adrenal cells by peptide hormones and growth factors. *Steroids* 1996;61:176-183.

- 259 Penhoat A, Rainey WE, Viard I, Saez JM: Regulation of adrenal cell-differentiated functions by growth factors. *Horm Res* 1994;42:39-43.
- 260 Penhoat A, Sanchez P, Jaillard C, Langlois D, Begeot M, Saez JM: Human proopiomelanocortin-(79-96), a proposed cortical androgen-stimulating hormone, does not affect steroidogenesis in cultured human adult adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;72:23-26.
- 261 Pere A, Perheentupa J, Peter M, Voutilainen R: Follow up of growth and steroids in premature adrenarche. *Eur J Pediatr* 1995;154:346-352.
- 262 Peter M, Partsch C, Sippell WG: Patientinnen mit Prämaturer Pubarche bzw. Hirsutismus und erhöhten Delta-5-Steroiden: Diagnostik sowie Therapie mit Glucocorticoiden.; in: Schulte H M, Benker M, Allolio B (eds): Therapie mit Glukokortikoiden - Molekularbiologische, pharmakologische und klinische Aspekte Stuttgart, Schattauer, 1994, pp 89-97.
- 263 Peter M, Sippell WG, Lorenzen F, Willig RP, Westphal E, Grosse-Wilde H: Improved test to identify heterozygotes for congenital adrenal hyperplasia without index case examination. *Lancet* 1990;335:1296-1299.
- 264 Pham-Huu-Trung MT, Villette JM, Bogyo A, Duclos JM, Fiet J, Binoux M: Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on enzymatic activity in human adrenocortical cells. Interactions with ACTH. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;39:903-909.
- 265 Pillion DJ, Arnold P, Yang M, Stockard CR, Grizzle WE: Receptors for insulin and insulin-like growth factor-I in the human adrenal gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:204-211.
- 266 Pintor C, Loche S, Faedda A, Fanni V, Nurchi AM, Corda R: Adrenal androgens in obese boys before and after weight loss. *Horm Metab Res* 1984;16:544-548.
- 267 Polderman KH, Gooren LJ, van der Veen EA: Testosterone administration increases adrenal response to adrenocorticotrophin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;40:595-601.
- 268 Prader A, Largo R, Molinari L, Issler C: Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. *Helv Paediatr Acta* 1989;Suppl 52:1-125.
- 269 Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC: Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 1998;139:4264-4268.
- 270 Prando A, Wallace S, Marins JL, Pereira RM, de Oliveira ER: Sonographic findings of adrenal cortical carcinomas in children. *Pediatr Radiol* 1990;20:163-165.
- 271 Rappaport R, Goldstein S, Skuzak K, Robey C, Hess A, Chow J: Adrenal steroidogenic defects in children and adolescents with disorderd puberty. *Proc 70th Annual Meet of Endocrine Soc* 1988;211.
- 272 Reincke M, Beuschlein F, Slawik M, Borm K: Molecular adrenocortical tumourigenesis. *Eur J Clin Invest* 2000;30 Suppl 3:63-68.
- 273 Reincke M, Fassnacht M, Vath S, Mora P, Allolio B: Adrenal incidentalomas: a manifestation of the metabolic syndrome? *Endocr Res* 1996;22:757-761.
- 274 Remer T, Manz F: Role of nutritional status in the regulation of adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3936-3944.
- 275 Remer T, Manz F: The midgrowth spurt in healthy children is not caused by adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4183-4186.
- 276 Renz M, Tomlinson E, Hultgren B, Levin N, Gu Q, Shimkets RA, Lewin DA, Stewart TA: Quantitative expression analysis of genes regulated by both obesity and leptin reveals a regulatory loop between leptin and pituitary-derived ACTH. *J Biol Chem* 2000;275:10429-10436.
- 277 Ribeiro RC, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, DeLacerda L, Sandrini F, Pianovsky MD, Sampaio G, Sandrini R: Adrenocortical tumors in children. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:1225-1234.
- 278 Rich BH, Rosenfield RL, Lucky AW, Helke JC, Otto P: Adrenarche: changing adrenal response to adrenocorticotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:1129-1136.

- 279 Roemmich JN, Clark PA, Berr SS, Mai V, Mantzoros CS, Flier JS, Weltman A, Rogol AD: Gender differences in leptin levels during puberty are related to the subcutaneous fat depot and sex steroids. *Am J Physiol* 1998;275:E543-E551.
- 280 Rosenbaum M, Leibel RL: Obesity in childhood. *Pediatr Rev* 1989;11:43-55.
- 281 Rosenfield RL: Normal and almost normal precocious variations in pubertal development premature pubarche and premature thelarche revisited. *Horm Res* 1994;41 Suppl 2:7-13.
- 282 Rosenfield RL: Evidence that idiopathic functional adrenal hyperandrogenism is caused by dysregulation of adrenal steroidogenesis and that hyperinsulinemia may be involved. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:878-880.
- 283 Roy AK: Regulation of steroid hormone action in target cells by specific hormone-inactivating enzymes. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;199:265-272.
- 284 Rudd BT, Rayner PH, Bassett RM, Williams JW: Serum dehydroepiandrosterone (DHA) and sulphate (DHAS) after acute growth hormone therapy. *Acta Paediatr Scand* 1980;69:287-292.
- 285 Rutishauser J, Schmid C, Hauri C, Froesch ER, Zapf J: Growth hormone, but not insulin-like growth factor I, induces a serum protease activity for insulin-like growth factor binding protein-3 in hypophysectomized rats in vivo. *FEBS Lett* 1993;334:23-26.
- 286 Saenger P, DiMartino-Nardi J: Premature adrenarche. *J Endocrinol Invest* 2001;24:724-733.
- 287 Saenger P, Reiter EO: Premature adrenarche: a normal variant of puberty? *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:236-238.
- 288 Saez JM, Perrard-Sapori MH, Chatelain PG, Tabone E, Rivarola MA: Paracrine regulation of testicular function. *J Steroid Biochem* 1987;27:317-329.
- 289 Sakkal-Alkaddour H, Zhang L, Yang X, Chang YT, Kappy M, Slover RS, Jorgensen V, Pang S: Studies of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase genes in infants and children manifesting premature pubarche and increased adrenocorticotropin-stimulated delta 5-steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3961-3965.
- 290 Sara VR, Hall K: Insulin-like growth factors and their binding proteins. *Physiol Rev* 1990;70:591-614.
- 291 Sasano H, Sato F, Shizawa S, Nagura H, Coughtrie MW: Immunolocalization of dehydroepiandrosterone sulfotransferase in normal and pathologic human adrenal gland. *Mod Pathol* 1995;8:891-896.
- 292 Schiebinger RJ, Albertson BD, Cassorla FG, Bowyer DW, Geelhoed GW, Cutler GB, Jr., Loriaux DL: The developmental changes in plasma adrenal androgens during infancy and adrenarche are associated with changing activities of adrenal microsomal 17-hydroxylase and 17,20-desmolase. *J Clin Invest* 1981;67:1177-1182.
- 293 Schoenle E, Zapf J, Froesch ER: Regulation of rat adipocyte glucose transport by growth hormone: no mediation by insulin-like growth factors. *Endocrinology* 1983;112:384-386.
- 294 Schöneshöfer M: Simultaneous determination of eight adrenal steroids in human serum by radioimmunoassay. *J Steroid Biochem* 1977;8:995-1009.
- 295 Siegel SF, Finegold DN, Urban MD, McVie R, Lee PA: Premature pubarche: etiological heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:239-247.
- 296 Silfen ME, Manibo AM, Ferin M, McMahon DJ, Levine LS, Oberfield SE: Elevated free IGF-I levels in prepubertal Hispanic girls with premature adrenarche: relationship with hyperandrogenism and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:398-403.
- 297 Sippell WG, Bidlingmaier F, Becker H, Brunig T, Dorr H, Hahn H, Golder W, Hollmann G, Knorr D: Simultaneous radioimmunoassay of plasma aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol and cortisone. *J Steroid Biochem* 1978;9:63-74.

- 298 Sizonenko PC: Endocrinology in preadolescents and adolescents. I. Hormonal changes during normal puberty. *Am J Dis Child* 1978;132:704-712.
- 299 Sizonenko PC, Paunier L: Failure of dehydroepiandrosterone enanthate to promote growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:1322-1324.
- 300 Sklar CA, Kaplan SL, Grumbach MM: Evidence for dissociation between adrenarche and gonadarche: studies in patients with idiopathic precocious puberty, gonadal dysgenesis, isolated gonadotropin deficiency, and constitutionally delayed growth and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:548-556.
- 301 Slayden SM, Moran C, Sams WM, Jr., Boots LR, Azziz R: Hyperandrogenemia in patients presenting with acne. *Fertil Steril* 2001;75:889-892.
- 302 Smith CP, Dunger DB, Williams AJ, Taylor AM, Perry LA, Gale EA, Preece MA, Savage MO: Relationship between insulin, insulin-like growth factor I, and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations during childhood, puberty, and adult life. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:932-937.
- 303 Smith R, Mesiano S, Chan EC, Brown S, Jaffe RB: Corticotropin-releasing hormone directly and preferentially stimulates dehydroepiandrosterone sulfate secretion by human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2916-2920.
- 304 Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC: Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 1992;90:584-595.
- 305 Speiser PW, Serrat J, New MI, Gertner JM: Insulin insensitivity in adrenal hyperplasia due to nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1421-1424.
- 306 Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB: Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1110-1115.
- 307 Stewart PM, Toogood AA, Tomlinson JW: Growth hormone, insulin-like growth factor-I and the cortisol-cortisone shuttle. *Horm Res* 2001;56 Suppl 1:1-6.
- 308 Stocco DM: StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol* 2001;63:193-213.
- 309 Stratakis CA, Karl M, Schulte HM, Chrousos GP: Glucocorticosteroid resistance in humans. Elucidation of the molecular mechanisms and implications for pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci* 1994;746:362-374.
- 310 Stuart CA, Prince MJ, Peters EJ, Meyer WJ, III: Hyperinsulinemia and hyperandrogenemia: in vivo androgen response to insulin infusion. *Obstet Gynecol* 1987;69:921-925.
- 311 Suter KJ, Pohl CR, Wilson ME: Circulating concentrations of nocturnal leptin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I increase before the onset of puberty in agonadal male monkeys: potential signals for the initiation of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:808-814.
- 312 Suzuki T, Sasano H, Takeyama J, Kaneko C, Freije WA, Carr BR, Rainey WE: Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:739-747.
- 313 Tanner JM, Whitehouse RH: A note on the bone age at which patients with true isolated growth hormone deficiency enter puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;41:788-790.
- 314 Tchernof A, Despres JP, Belanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, Lupien PJ, Labrie F: Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men. *Metabolism* 1995;44:513-519.
- 315 Teixeira RJ, Silva VC, Gazolla HM, Cunha SB, Guimaraes MM: The relationship between ovarian structure and serum insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its binding protein (IGFBP-1 and IGFBP-3) levels in premature pubarche. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:69-75.

- 316 Temeck JW, Pang SY, Nelson C, New MI: Genetic defects of steroidogenesis in premature pubarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:609-617.
- 317 Voutilainen R: Adrenocortical cells are the site of secretion and action of insulin-like growth factors and TNF-alpha. *Horm Metab Res* 1998;30:432-435.
- 318 Voutilainen R, Miller WL: Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain-cleavage enzyme, P450scc [corrected], in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:1590-1594.
- 319 Voutilainen R, Perheentupa J, Apter D: Benign premature adrenarche: clinical features and serum steroid levels. *Acta Paediatr Scand* 1983;72:707-711.
- 320 Voutilainen R, Riikonen R, Simell O, Perheentupa J: The effect of ACTH therapy on serum dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone in infants. *J Steroid Biochem* 1987;28:193-196.
- 321 Vuguin P, Linder B, Rosenfeld RG, Saenger P, DiMartino-Nardi J: The roles of insulin sensitivity, insulin-like growth factor I (IGF-I), and IGF-binding protein-1 and -3 in the hyperandrogenism of African- American and Caribbean Hispanic girls with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2037-2042.
- 322 Vuguin P, Saenger P, DiMartino-Nardi J: Fasting glucose insulin ratio: a useful measure of insulin resistance in girls with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4618-4621.
- 323 Wabitsch M, Blum W, Mucbe R, Braun M, Huber F, Rascher W, et al.: Contribution of androgens to the gender difference in leptin production in obese children and adolescents. *J Clin Invest* 1997;100:808-813.
- 324 Wabitsch M, Blum WF, Mucbe R, Heinze E, Haug C, Mayer H, Teller W: Insulin-like growth factors and their binding proteins before and after weight loss and their associations with hormonal and metabolic parameters in obese adolescent girls. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996;20:1073-1080.
- 325 Weber A, Clark AJ, Perry LA, Honour JW, Savage MO: Diminished adrenal androgen secretion in familial glucocorticoid deficiency implicates a significant role for ACTH in the induction of adrenarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:431-437.
- 326 Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D: Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol* 1997;136:296-303.
- 327 Westphal S. Rolle des nicht-klassischen 3beta-Hydroxysteroiddehydrogenase-Mangels bei Kindern mit Prämaturer Pubarche. 1997. Dissertation. Humboldt-University Berlin.
- 328 Westphal S, l'Allemand D, Peter M, Zachmann M, Grüters A: A longitudinal survey of premature adrenarche: the role of mild 3β-hydroxysteroid-dehydrogenase-deficiency. *Horm Res* 1995;44 :46.
- 329 Winterer J, Gwirtsman HE, George DT, Kaye WH, Loriaux DL, Cutler GB, Jr.: Adrenocorticotropin-stimulated adrenal androgen secretion in anorexia nervosa: impaired secretion at low weight with normalization after long-term weight recovery. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:693-697.
- 330 Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Hoffman EP: Hyperandrogenism and manifesting heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency. *Biochem Mol Med* 1997;62:151-158.
- 331 Woelfle J, Hoepffner W, Sippell WG, Bramswig JH, Heidemann P, Deiss D, Bokenkamp A, Roth C, Irle U, Wollmann HA, Zachmann M, Kubini K, Albers N: Complete virilization in congenital adrenal hyperplasia: clinical course, medical management and disease-related complications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002;56:231-238.
- 332 Wudy S: Clinical and endocrinological findings in adult females who had been diagnosed with idiopathic premature pubarche. in: Montreal, Canada, 2001, p 3.
- 333 Yamaguchi Y, Tanaka S, Yamakawa T, Kimura M, Ukawa K, Yamada Y, Ishihara M, Sekihara H: Reduced serum dehydroepiandrosterone levels in diabetic patients with hyperinsulinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:377-383.

- 334 Young J, Couzinet B, Pholsena M, Nahoul K, Labrie F, Schaison G: Plasma 3 beta-hydroxy-delta 5-steroids in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:299-304.
- 335 Zachmann M, Prader A: Unusual heterozygotes of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1978;87:557-565.
- 336 Zapf J, Froesch E: Insulin-like growth factor I actions on somatic growth; in: Kostyo J, Goodman H (eds): *Hormonal control of growth* New York, Oxford University Press, 1999, vol Section 7, V, pp 663-699.
- 337 Zapf J, Gosteli-Peter M, Schmid Ch: Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs).; in: Merimee T J, .Laron Z (eds): *Groth hormone, IGF-I and Growth*. London, Freund, 1996, pp 45-71.
- 338 Zapf J, Walter H, Froesch E: Radioimmunological determination of insulin-like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Clin Invest* 1981;68:1321-1330.
- 339 Zieger G, Schmitt A, Siebels C, Kubatsch B: [Histological changes in the adrenal cortex of the Syrian hamster following perinatal treatment with sex steroids]. *Anat Anz* 1980;147:327-339.
- 340 Zuber MX, John ME, Okamura T, Simpson ER, Waterman MR: Bovine adrenocortical cytochrome P-450(17 alpha). Regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *J Biol Chem* 1986;261:2475-2482.
- 341 Zurbrügg R. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation: a contribution to its assessment, development and disorders in infancy and childhood with special reference to plasma circadian rhythm. [7]. 1976. Basel, Karger. Monographs in Paediatrics.

Danksagung

Ganz besonders danken möchte ich Frau Prof. Dr. Annette Grüters, die nicht nur als erste mich für die pädiatrische Endokrinologie begeisterte, sondern mich auch über viele Jahre stets freundschaftlich beriet und tatkräftig unterstützte. Herrn Prof. Dr. Hans Helge bin ich dankbar, weil er mein Interesse für die kindliche Nebennierenfunktion weckte und die Selbständigkeit meines wissenschaftlichen Arbeitens förderte. Herrn Prof. Dr. Jose Saez verdanke ich die Anregung zur vorliegenden Thematik, ebenso wie die Erläuterung der zell- und molekularbiologischen Grundlagen der Nebennieren-in-vitro-Untersuchungen. Ich bin sehr froh, dass ich noch lange nach Abschluss meines Ausbildungsstipendiums am INSERM Institut in Lyon auf seinen wohlwollenden Rat und den seiner Mitarbeiterinnen vertrauen konnte.

Mein Dank gilt allen, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, die vorliegenden Ergebnisse zu erzielen. Hier bin ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Oelkers am Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin, zu grossem Dank verpflichtet, weil er mir selbstlos Räume der endokrinologischen Arbeitsgruppe und technische Möglichkeiten zur Verfügung stellte. Er und seine Mitarbeiter, Herr Dr. Volker Bähr und Frau Petra Exner, halfen mit Rat und Tat bei den experimentellen Untersuchungen. Diese wären ohne die geschickte technische Mitarbeit von Frau Dominique Gritscher, die ich im Rahmen des Habilitationsstipendiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft einstellen konnte, nicht möglich gewesen.

Ich bin gleichermassen sehr dankbar für die tatkräftige Unterstützung bei den klinischen Untersuchungen an der Berliner Universitäts-Kinderklinik, die mir von den Schwestern der Poliklinik und den Mitarbeitern des pädiatrisch-endokrinologischen Labors, vor allem Frau Bettina Tippel, Herrn Bernd Berger und Frau Gabi Sahn gewährt wurde. Hier sind auch die Doktoranden, Frau Dr. Silke Westphal und Herr Stefan Schmidt in grösster Anerkennung zu nennen.

Nach meinem Umzug 1998 war die Unterstützung von Herrn Priv.-Doz. Dr. Urs Eiholzer, Stiftung Wachstum Pubertät Adoleszenz, Zürich, für mich essentiell und half mir, mich beruflich in der Schweiz zurechtzufinden. Dafür danke ich ihm und seinen Mitarbeitern, Frau Claudia Weinmann und Herrn Michael Schlumpf, besonders herzlich, ebenso wie für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit und die grosszügige technische Hilfe beim Fertigstellen der vorliegenden Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken: meinem Mann, der mir den Freiraum für die wissenschaftlichen Aktivitäten verschaffte, und meinem Sohn Felix, der nicht nur meine Abwesenheit tolerierte, sondern mich geradezu zum Arbeiten ermutigte. Auch meinen Eltern sei an dieser Stelle gedankt für die Ausbildung und immerwährende Unterstützung, besonders meiner Mutter für die Beratung bei medizinisch-technischen Problemen.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift