

FREKVENCE VÝSKYTU VROZENÝCH DNA POLYMORFIZMŮ GENŮ SYNTETICKÉ DRÁHY TESTOSTERONU V ČESKÉ POPULACI PACIENTŮ S KARCINOMEM PROSTATY

L. Benešová¹, L. Fantová¹, J. Heráček^{2,3}, M. Urban^{2,3}, J. Sachová², M. Minárik¹

¹Laboratoř molekulární genetiky a onkologie Genomac International, Praha

²Urologická klinika FNKV a 3. LF UK, Praha

³Androgeos soukromé urologické a andrologické centrum, Praha

Souhrn

Cíl: Růst prostatických buněk závisí na hladině aktivního testosteronu, který je již v nízkých dávkách významným tumor promotorem. Sledování aktivity genů zapojených do regulace syntézy testosteronu má proto význam pro výzkum mechanismu vzniku a proliferace nádorových buněk prostaty. Hlavním záměrem prezentované studie bylo zjištění výskytu a frekvencí nejvýznamnějších jednonukleotidových polymorfizmů skupiny genů syntetické dráhy testosteronu v české populaci u pacientů s karcinomem prostaty.

Metodika: Do studie bylo zařazeno celkem 237 pacientů s karcinomem prostaty a 229 kontrolních osob s klinicky ověřenou diagnózou benigní hyperplazie. U každé osoby bylo provedeno vyšetření sady 30 jednonukleotidových polymorfizmů z DNA získané z periferních lymfocytů.

Výsledky: Získané frekvence výskytu polymorfních alel se mezi skupinou pacientů s karcinomem a pacientů s benigní hyperplazií u většiny markerů výrazně neliší. Nadějným výsledkem je však identifikace markeru SR-49B (dbSNP ID rs4952219) v genu SRD5A2, u kterého byl zjištěn statisticky významný rozdíl poměrů jednotlivých alel i jednotlivých genotypů při srovnání sledované a kontrolní skupiny.

Diskuze: Polymorfismus SR-49B má potenciál pro odhad vrozené predispozice výskytu karcinomu prostaty. Žádný z ostatních sledovaných markerů takovou asociaci nevysvětluje.

Klíčová slova: karcinom prostaty, DNA, polymorfizmy, genotypování, CYP17A1, CYP3A4, SRD5A2.

THE INCIDENCE RATE OF CONGENITAL DNA POLYMORPHISMS OF GENES OF TESTOSTERONE SYNTHESIS PATHWAYS IN A POPULATION OF CZECH PATIENTS WITH PROSTATE CANCER

Abstract

Aim: Prostate cell growth is dependent upon the level of active testosterone which, even at low levels, is a significant tumour promoter. Thus, monitoring the activity of the genes involved in the regulation of testosterone synthesis is of relevance for investigating the mechanism of prostate tumour cell origin and proliferation. The main goal of the present study was to determine the incidence rates of the most significant single nucleotide polymorphisms of genes of testosterone synthesis pathways in a population of Czech patients with prostate cancer.

Methods: The study included a total of 237 patients with prostate cancer and 229 controls with a clinically confirmed diagnosis of benign hyperplasia. Each person underwent an examination of a set of 30 single nucleotide polymorphisms from DNA obtained from peripheral lymphocytes.

Results: The incidence rates obtained on polymorphic alleles did not differ significantly in most markers between the group of cancer patients and the group of patients with benign hyperplasia. However, a promising result is the identification of the SR-49B marker (dbSNP ID rs4952219) in the SRD5A2 gene in which a statistically significant difference of the ratios of individual alleles as well as of individual genotypes was found when the two patient groups were compared.

Discussion: The SR-49B polymorphism has the potential to predict a congenital predisposition for developing prostate cancer. No such association was detected in any of the other markers observed.

Key words: prostate cancer, DNA, polymorphisms, genotyping, CYP17A1, CYP3A4, SRD5A2

Česká urologie 2007; 11(2): 80–84

1. Úvod

Karcinom prostaty (KP) je na druhém místě v incidenci nádorových onemocnění u mužů. Populační incidence nádoru prostaty vykazuje závislost na celé řadě faktorů. Mezi hlavními jsou rasa, věk a rodinná historie tohoto onemocnění. Je dokázáno, že zatímco afro-ame-

rická populace vykazuje téměř dvakrát vyšší incidenci ve srovnání s evropskou populací, nejnižší výskyt je u Asiátů. Uvedené rasové předpoklady mohou naznačovat genetické predispozice, avšak i ty lze interpretovat jako působení vnějších karcinogenních promotorů podle geografické lokace nebo rozdíly volby medicínských postu-

pů. Nejvyšší incidence karcinomu prostaty v Evropě je ve Finsku – 110,87/100 000 mužů (mortalita 29,5/100 000) a je například 4× vyšší než v Řecku, kde je 30,87/100 000 mužů (mortalita 16,6) (1). Čísla v ČR se pohybují někde uprostřed těchto krajních hodnot. V roce 2003 byla incidence karcinomu prostaty 46/100 000 mužů a mortalita 16/100 000 mužů (2). Ve státech Evropské unie je ročně diagnostikováno 85 000 nových případů karcinomu prostaty, v České republice pak přibližně 2 500 případů ročně. Závislost na věku naznačuje významnost dlouhé exponovanosti endogenními (hormony) nebo exogenními faktory (vnější karcinogeny). Padesátiletý muž se životním výhledem 25 let má riziko mikroskopického nálezu karcinomu prostaty 30%, klinicky signifikantního nálezu 10% a riziko úmrtí na karcinom prostaty 3%. Nejnovější epidemiologické údaje svědčí o tom, že muž s lokalizovaným a dobře diferencovaným karcinomem prostaty, má 9% riziko úmrtí na tento karcinom do 15 let. Přibližně třetina pacientů má stanovenou diagnózu v době lokalizovaného onemocnění, necelých 20% pak v době generalizace. Poslední významný faktor tohoto onemocnění – rodinná anamnéza jasně ukazuje na genetickou predispozici. Nedávné studie teorii existence těchto genetických predispozic jednoznačně podporují.

Je známo, že růst prostatických buněk závisí na hladině aktivního testosteronu. Vzhledem k tomu, že u myší může být adenokarcinom prostaty vyvolán silnými dávkami testosteronu, je pravděpodobné, že testosteron je již v nízkých dávkách významným tumor promotorem. Studie popisující vysoké hladiny testosteronu u pacientů s nádorem prostaty jsou výjimečné, naopak nízké hladiny testosteronu, indukující androgenovou nezávislost, byly označeny za produkt velmi agresivních forem této nemoci a celkově horší prognózu u pokročilých stadií. Zdá se tedy pravděpodobné, že nikoli vysoké hladiny testosteronu, ale především dlouhodobá expozice testosteronu způsobuje predispozici ke vzniku nádoru prostaty. Ve shodě s touto hypotézou je i to, že se nádor objevuje především ve vyšším věku a že toto onemocnění nepostihuje muže kastrované v mladém věku. Z popsanych důvodů jsou geny mající roli při syntéze testosteronu potenciálními kandidáty při sledování molekulárně-genetického mechanismu růstu nádorových buněk prostaty (3).

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNP) jsou jednoduché záměny (substituce) nukleotidů v DNA sekvenci, které lze vypočítat v průměru každých 200–300 bází. Nacházejí se v kódujících (exonech) i nekódujících (intronech) částech genů a představují nejčastější formu ge-

nových variací. Na rozdíl od vrozených bodových mutací, u kterých lze ze záměny báze vysledovat přímou spojitost se změnou funkce proteinu, funkční důsledek SNP často nelze přímo identifikovat. Vzhledem k jejich častému výskytu v regulačních regionech jako jsou například místa vázání transkripčních faktorů, se jejich působení často prezentuje jako ovlivňování genové exprese. Z tohoto důvodu je jim také připisována hlavní role v dědičnosti při rozdílech v genetické predispozici onemocnění, včetně nádorů prostaty (4).

Tabulka 1. Rozdělení frekvence alel sledovaných polymorfismů. Uváděné hodnoty odpovídají skupině pacientů s karcinomem (KP), kontrolní skupině benigních hyperplazií (BHP) a obecnému rozdělení alel v evropskou/kavkazské populaci dle veřejných databází.

A – polymorfizmy genu CYP17A1

Marker	Testovaná skupina	Alela 1	Alela 2
		C	A
	KP pacienti	0,269	0,731
CY-S7	BHP kontroly	0,309	0,691
rs743575	Databáze	0,333	0,667
		C	G
	KP pacienti	0,147	0,853
CY-S8	BHP kontroly	0,130	0,870
rs3824755	Databáze	0,104	0,896
		A	G
	KP pacienti	0,043	0,957
CY-S8B	BHP kontroly	0,033	0,967
rs284847	Databáze	0,025	0,975
		G	A
	KP pacienti	0,403	0,597
CY-S29	BHP kontroly	0,401	0,599
rs743572	Databáze	0,400	0,600
		A	G
	KP pacienti	0,424	0,576
	BHP kontroly	0,454	0,546
CY-S31 rs6162	Databáze	0,408	0,592
		A	C
	KP pacienti	0,393	0,607
	BHP kontroly	0,422	0,575
CY-S32rs6163	Databáze	0,392	0,608

B – polymorfizmy genu CYP3A4

Marker	Testovaná skupina	Alela 1	Alela 2
		A	T
	KP pacienti	0,094	0,906
CP-S5	BHP kontroly	0,074	0,926
rs12333983	Databáze	0,117	0,883
		T	C
	KP pacienti	0,096	0,904
CP-S13	BHP kontroly	0,083	0,917
rs4646437	Databáze	0,133	0,867
		T	C
	KP pacienti	0,032	0,968
CP-S47	BHP kontroly	0,039	0,961
rs1851426	Databáze	0,042	0,958

Marker	Testovaná skupina	Alela 1	Alela 2				
	KP pacienti	A 0,393	G 0,607		KP pacienti	A 0,108	G 0,892
SR-49B rs4952219	BHP kontroly Databáze	0,467 0,625	0,533 0,375	SR-S1 rs1042578	BHP kontroly Databáze	0,162 0,068	0,838 0,932
	KP pacienti	T 0,466	C 0,534		KP pacienti	T 0,990	C 0,010
SR-124 rs12470143	BHP kontroly Databáze	0,491 0,6250,625	0,509 0,375	SR-S4 nenalezen	BHP kontroly Databáze	0,861	0,139
	KP pacienti	G 0,478	A 0,522		KP pacienti	A 0,510	G 0,490
SR-220 rs2208532	BHP kontroly Databáze	0,404 0,342	0,596 0,658	SR-S12 rs413836	BHP kontroly Databáze	0,388 0,250	0,612 0,750
	KP pacienti	T 0,532	C 0,468		KP pacienti	G 0,328	C 0,672
SR-236 rs2365778	BHP kontroly Databáze	0,489 0,625	0,511 0,675	SR-S15A rs1475054	BHP kontroly Databáze	0,236 0,150	0,764 0,850
	KP pacienti	T 0,331	C 0,669		KP pacienti	A 0,010	C 0,990
SR-275 rs2754530	BHP kontroly Databáze	0,317 0,792	0,683 0,208	SR-S15B rs12712317	BHP kontroly Databáze	0,125 0,036	0,875 0,964
	KP pacienti	G 0,307	T 0,693		KP pacienti	A 0,461	G 0,539
SR283A rs28383003	BHP kontroly Databáze	0,304 0,318	0,696 0,682	SR-S17 nenalezen	BHP kontroly Databáze	0,435	0,565
	KP pacienti	T 0,307	A 0,693		KP pacienti	A 0,309	G 0,691
SR-283B rs28383002	BHP kontroly Databáze	0,304 0,318	0,696 0,682	SR-S26 rs676033	BHP kontroly Databáze	0,298 0,200	0,702 0,800
	KP pacienti	C 0,429	A 0,571		KP pacienti	C 0,477	T 0,523
SR-495 rs4952220	BHP kontroly Databáze	0,459 0,275	0,541 0,725	SR-23 rs2300697	BHP kontroly Databáze	0,400 0,333	0,600 0,0697
	KP pacienti	G 0,331	T 0,669				
SR-612 rs612224	BHP kontroly Databáze	0,328 0,200	0,672 0,800				

Předkládaná studie měla za cíl screening SNP polymorfizmů u pacientů s nádorem prostaty pro nalezení vztahů s genetickou predispozicí u tohoto onemocnění. Studie byla zaměřena na skupinu vybraných 30ti polymorfizmů v genech syntetické dráhy testosteronu CY-P17A1, CYP3A4 a SRD5A2 (5, 6, 7).

2. Materiál a metodika

2.1. Pacienti

Do studie bylo v zařazeno celkem 237 pacientů ve věku od 50 do 73 let s histopatologicky ověřeným karcinomem prostaty diagnostikovaných a léčených na Urologické klinice 3. LF UK a FNKV. Do souboru byli zařazeni pacienti s anamnesticky i nově diagnostikovaným (ověřeným) karcinomem prostaty. Verifikace byla prováděna s použitím digitálního rektálního vyšetření, hodnoty prostatického specifického antigenu (PSA), transrektálního sonografického vyšetření a histopatologického vyhodnocení biopsie prostaty, preparátu z radikální prostatektomie nebo transuretrální resekce prostaty. Současně byla vyhodnocena agresivita nádoru (Gleason score). Kontrolní skupinu tvořilo 229 pacientů s negativním nálezem. Negativita byla prokázána nízkou hodnotou věkově specifického PSA společně s neg-

ativním digitálním rektálním vyšetřením. Současně byla vždy také potvrzena histopatologickým nálezem benigní hyperplazie z preparátu transvezikální prostatektomie či transuretrální resekce prostaty.

Pacientům i kontrolám bylo odebíráno 10 ml nesrážlivé krve a zasláno na molekulárně-genetické vyšetření.

2.2. Molekulárně-genetický screening DNA polymorfizmů

Isolace DNA z krevních vzorků byla prováděna standardní metodou extrakce na kolonkách za použití komerčního kitu GMC blood DNA isolation kit (Genomac International, ČR). Sledované polymorfizmy byly vytipovány na základě výběru ve veřejně přístupných SNP databázích GeneSNPs, HGMD, dbSNP a HGVbase. Amplifikace úseků obsahujících sledované polymorfizmy (typicky o délce 100–140 bází) byla provedena s použitím podmínek specifických pro danou sekvenční oblast. Při amplifikaci bylo použito fluorescenční značení jednoho s použitých primerů. Po reakci byly fluorescenčně značené amplifikáty analyzovány v multikapilárním genetickém analyzátoru. Screening byl prováděn s použitím techniky kapilární elektroforézy v cyklickém teplotním gradientu (Cycling Gradient Capillary Electrophoresis, CGCE). Tato metoda je založena na principu separace

heteroduplexů za podmínek jejich částečné denaturace (8). Z úvodní skupiny cca 85 kandidátů byla provedena selekce konečných 30ti markerů na základě optimalizace podmínek PCR a CGCE. Detailní popis metodiky optimalizace jednotlivých markerů a následného screeningu krevních vzorků sledované a kontrolní skupiny byl publikován separátně (9).

2.3. Statistické hodnocení

Statistická významnost rozdělení alel a rozdělení genotypů u sledované a kontrolní skupiny byla zjišťována s použitím neparametrického χ^2 testu na 5% hladině významnosti.

3. Výsledky

Bylo provedeno vyšetření 30 markerů u skupiny 237 pacientů s diagnózou karcinomu prostaty a 229 kontrolních subjektů s nálezem benigní hyperplazie prostaty, úhrnem se tedy jednalo o 13 980 genotypizačních vyšetření. U každého sledovaného polymorfního markeru byla vypracována distribuce alel pro skupinu karcinomů a pro kontrolní skupinu. Současně byla v databázích vyhledána udávaná průměrná distribuce pro evropskou/kavkazskou populaci. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1A až C.

4. Diskuze

Studium aktivity genů účastnících se systému testosteronové syntézy a odbourávání je již řadu let v popředí zájmu výzkumu mechanismů vzniku a progresu karcinomu prostaty. Prvním z genů, na který byl v této studii výběr zaměřen, je gen z rodiny Cytochrom P450 označovaný jako CYP17A1 kódující steroid 17-alfa-hydroxylázu, který svojí lyázovou aktivitou umožňuje syntézu testosteronu ve varlatech (10). V tomto genu bylo vyšetřováno celkem 10 polymorfních markerů (viz Tabulka 1A). Při srovnání frekvencí alel skupiny karcinomů a kontrolní skupiny nebyla ani v jedné případě odhalena významná odchylka, poměry alel odpovídají průměrnému rozdělení pro evropskou/kavkazskou populaci uváděném v mezinárodních databázích.

Dalším genem byl Cytochrom P450 3A4, CYP3A4, který je jedním ze základních metabolických faktorů účastnících se řady významných metabolických drah, včetně androgenní syntézy a odbourávání testosteronu (11). Zde byly vyšetřovány 3 polymorfizmy (viz tabulka 1B). Ani v tomto případě nebyla u žádného ze sledovaných polymorfizmů vysledována statisticky významná odchylka rozdělení alel skupiny karcinomů oproti kontrolní

skupině BHP. U jednoho CYP3A4 polymorfizmů byl zjištěn statisticky významný rozdíl v poměrech jednotlivých alel oproti průměrným hodnotám získaným z databáze. U markeru CP-S5 (dbSNP ID rs12333983) byl zjištěn poměr alel A/T u kontrolní skupiny 10%/90%, zatímco poměr uváděný v databázích pro evropskou/kavkazskou populaci je 15%/85%. Rozdíl je statisticky významný ($\chi^2 = 5,31$, $p \leq 0,025$) a může vyjadřovat specifitu zvolené kontrolní populace pacientů s diagnózou benigní hyperplazie. Vzhledem k relativně nízkému počtu vzorků analyzovaných pro zápis do mezinárodní databáze (udávaná hodnota 110 genotypů) však z tohoto nelze usuzovat přímo na roli tohoto markeru v genetické predispozici BHP.

Poslední ze sledovaných genů byl gen pro steroidní 5-alfa reduktázu (SRD5A2), který katalyzuje konverzi testosteronu na aktivní formu dihydrotestosteron (12). V tomto genu bylo vyšetřeno celkem 17 polymorfních markerů. U markerů SR-23 (dbSNP ID rs2300697) byl poměr alel C/T u karcinomů 48%/52%, zatímco tabulková hodnota populačního rozdělení z databáze je 33%/66%. Rozdíl je statisticky významný ($\chi^2 = 6,69$, $p \leq 0,01$), avšak vzhledem k tomu, že při přímém srovnání karcinomů a kontrol získaných v této studii významný rozdíl nalezen nebyl ($\chi^2 = 2,66$, $p \leq 0,20$), lze shora uvedené zjištění i v tomto případě považovat za odchylku použité populace BHP pacientů oproti průměrné normální populaci uvedené v databázi. I v tomto případě by pro prokázání genetické predispozice BHP bylo třeba provést genotypování více vzorků normální populace.

Patrně nejzajímavějším výsledkem předkládané studie je však výsledek pro SRD5A2 marker SR-49B (dbSNP ID rs4952219). Poměr alel A/G u karcinomů byl 39%/61%, což je statisticky významně odlišné od poměru alel získaného pro kontrolní skupinu 47%/53% ($\chi^2 = 5,33$, $p \leq 0,025$). U tohoto markeru bylo následně provedeno i srovnání výskytu jednotlivých genotypů. U skupiny karcinomů to bylo 38 homozygotů AA, 111 heterozygotů AG a 88 homozygotů GG, zatímco u kontrolní skupiny to bylo 61 homozygotů AA, 93 heterozygotů AG a 76 homozygotů GG. I pro rozdělení genotypů byl u tohoto polymorfizmu zjištěn statisticky významný rozdíl ($\chi^2 = 7,71$, $p \leq 0,025$).

5. Závěr

V prezentovaném projektu bylo provedeno vyšetření celkem 30 DNA polymorfizmů v genech syntetické dráhy testosteronu. Při srovnání skupiny 273 pacientů s karcinomem a 229 pacientů s nálezem benigní hyperplazie nebyl u naprosté většiny markerů nalezen významný rozdíl

v poměru příslušných alel. Statisticky významné rozdíly poměrů alel u markerů CP-S5 (dbSNP ID rs12333983) v genu CYP3A4 a SR-23 (dbSNP ID rs2300697) při použití údajů normální populace z databáze lze připisovat volbě kontrolní skupiny pacientů s benigní dysplázií, případně také relativně nízkému počtu genotypů použitých pro údaje v mezinárodní databázi.

U markeru označeného jako SR-49B (dbSNP ID rs4952219) v genu SRD5A2 je zjištěn signifikantní rozdíl poměrů alel i poměru jednotlivých genotypů významným výsledkem indikujícím jeho potenciální asociaci s predispozicí ke karcinomu prostaty. Vzhledem k tomu, že tento marker zatím nebyl v literatuře v této souvislosti popsán, bylo by pro potvrzení třeba provést další vyhodnocení, především za použití rozboru dědičnosti jednotlivých genotypů u příbuzných pacientů s karcinomem.

Literatura

1. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, *Annals of Oncology*, 2005, 16, 481–488.
2. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Český národní webový portál epidemiologie nádorů [online]. Masarykova univerzita, (2005), 22. 2. 2007 [cit. 2007-2-22]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>.
3. Singh AS, Chau CH, Price DK, Figg WD. Mechanisms of disease: Polymorphisms of androgen regulatory genes in the development of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.*, 2005, 2, 101–107.
4. Gsur A, Feik E, Madersbacher S. Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol.* 2004.
5. Douglas JA, Zuhlke KA, Beebe-Dimmer J, Levin AM, Gruber SB, Wood DP, Cooney KA. Identifying susceptibility genes for prostate cancer-a family-based association study of polymorphisms in CYP17, CYP19, CYP11A1, and LH-beta. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Aug; 14 (8): 2035–2039.
6. Plummer SJ, Conti DV, Paris PL, Curran AP, Casey G, Witte JS. CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Sep; 12 (9): 928–932.
7. Hsing AW, Chen C, Chokkalingam AP, Gao YT, Dightman DA, Nguyen HT, Deng J, Cheng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Stanczyk FZ, Reichardt JK. Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 Oct; 10 (10): 1077–1082.

6. Poděkování

Autoři tímto děkují Dr. Anu Loukola z Finnish Genome centra v Helsinkách za velmi cenné konzultace a dále Patriku Sekerkovi za obětavou pomoc při genotypizačních experimentech a Janě Vlasákové za pomoc při odběru vzorků.

Práce byla provedena za podpory grantu IGA MZ NR/8039-3.

Zasláno redakci

18. 12. 2006

Akceptováno

23. 2. 2007

RNDr. Marek Minárik, Ph.D.

Genomac International, s.r.o.,
Laboratoř molekulární genetiky a onkologie
Bavorská 856, 155 41 Praha 5
e-mail: mminarik@email.com

8. Minarik M, Minarikova L, Bjorheim J, Ekstrom PO. Cycling Gradient Capillary Electrophoresis (CGCE): A low cost tool for high-throughput analysis of genetic variations, *Electrophoresis*, 2003, 24, 1716–1722.
9. Minarik M, Benesova L, Fantova L, Horacek J, Heracek J, Loukola A. Parallel optimization and genotyping of multiple single-nucleotide polymorphism markers by sample pooling approach using cycling-gradient CE with multiple injections. *Electrophoresis*. 2006, 27, 3856–3863.
10. Douglas JA, Zuhlke KA, Beebe-Dimmer J, Levin AM, Gruber SB, Wood DP, Cooney KA. Identifying susceptibility genes for prostate cancer-a family-based association study of polymorphisms in CYP17, CYP19, CYP11A1, and LH-beta. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14, 2035–2039.
11. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, Casey G, Witte JS. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999, 8, 901–905.
12. Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD, Russell DW. Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest.* 1992, 90, 799–809.