

## MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA KONGENITALNE ADRENALNE HIPERPLAZIJE (KAH-a) ZBOG MANJKA 21-HIDROKSILAZE

ZORANA GRUBIĆ\*

*Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je monogenetska autosomalna bolest koja je u više od 90% slučajeva uzrokovana manjkom 21-hidroksilaze, odnosno inaktivirajućim mutacijama unutar gena CYP21 koji kodira taj enzim. Većina mutacija rezultat je rekombinacije između aktivnog gena CYP21 i pseudogena CYP21P. Određivanje mutacija gena CYP21 u većini slučajeva se provodi uz pomoć lančane reakcije polimerazom i specifičnih početnica.*

Deskriptori: KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA, MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, 21-HIDROKSILAZA

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je monogenetska autosomalna bolest koja je uzrokovana poremećajem sinteze nekog od enzima koji sudjeluju u steroidogenezi, a u više od 90,0% slučajeva radi se o manjku 21-hidroksilaze. Za sintezu 21-hidroksilaze odgovoran je gen CYP21 koji se još naziva CYP21A2 i CYP21B. Osim aktivnog gena CYP21 postoji i pseudogen CYP21P (sinonimi CYP21A1P i CYP21A). Aktivni gen (CYP21) i pseudogen (CYP21P) smješteni su u centralnoj regiji unutar regije Glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. Human Leukocyte Antigens - HLA; 6p21.3), koja se nalazi na kraćem kraku kromosoma 6, i to na način da se izmjenjuju s genima C4B i C4A koji kodiraju četvrtu komponentu komplementa (Slika 1) (1).

Molekularna istraživanja otkrila su da je gen CYP21 smješten 600 kilobaza (kb) centromerno od lokusa HLA-B i 400 kb telomerno od lokusa HLA-DR. Veličina samog gena iznosi približno 3,1

kb. Važno je reći da su sekvence gena CYP21 i pseudogena CYP21P vrlo slične što se očituje u činjenici da su im egzoni identični u približno 98% sekvence, a introni u približno 96% sekvence. Oba su gena građena od 10 egzona i 9 introna (2).

Većina mutacija rezultat je dva tipa rekombinacija između aktivnog gena CYP21 i pseudogena CYP21P. Prvi mehanizam je nejednaka rekombinacija tijekom mejoze što za posljedicu ima potpunu deleciju gena C4B i ograničenu deleciju gena CYP21, dok je drugi mehanizam konverzija između aktivnog gena CYP21 i pseudogena CYP21P što za posljedicu ima premještanje štetnih mutacija iz pseudogena CYP21P u aktivni gen CYP21 što dovodi do promjene njegove aktivnosti.

Delecije gena CYP21P uključuju A3G zamjenu 13 nukleotida prije kraja introna 2 što dovodi do pogrešnog isijecanja pre-mRNA, delecije osam nukleotida u egzonu 3 i umetanja jednog nukleotida u egzonu 7. Sve navedene mutacije pomiču okvir čitanja što dovodi do promjene aminokiseline, odnosno do stvaranja stop kodona 318 u egzonu 8.

Svaka od mutacija gena CYP21 vodi do određenog oblika bolesti i odgovorne su za različitu produkciju odnosno

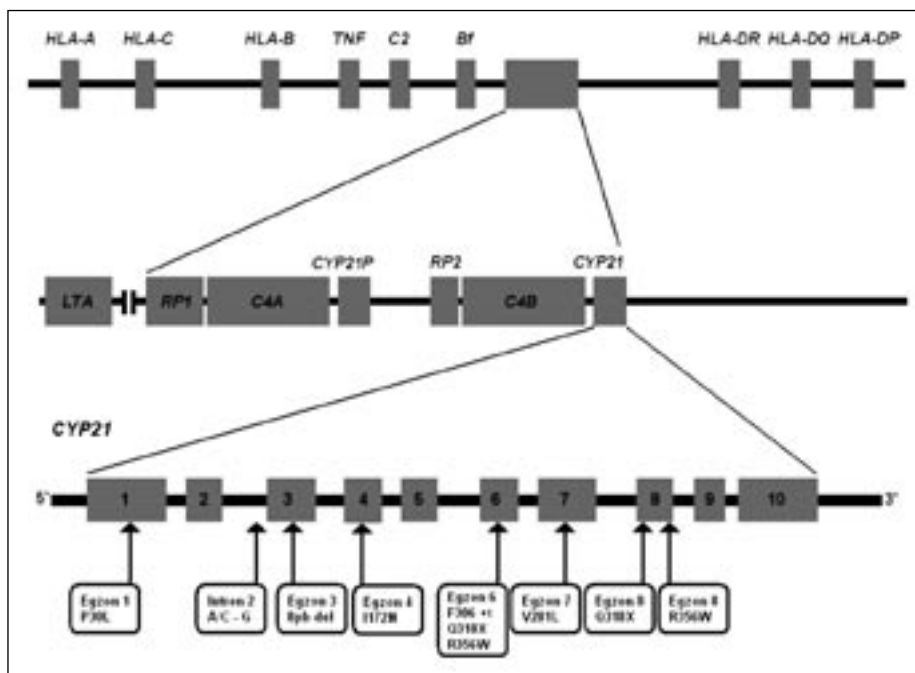
aktivnost enzima. Do danas je među bolesnicima s KAH-om otkriveno više od 50 različitih mutacija (3). Mutacije koje su posljedica genske konverzije čine 90-95% mutacija, dok se preostali postotak odnosi na mutacije koje nisu nastale kao rezultat genske konverzije i nisu prisutne u pseudogenu CYP21P.

Poznato je da je u približno 70% slučajeva bolesnika s KAH-om riječ o složenim heterozigotima, istovremeno je i nekoliko velikih istraživanja pokazalo je da klinička slika bolesti odgovara "manjoj" mutaciji odnosno mutaciji koja uzrokuje veću produkciju 21-OH (4). Međutim, kod određenog broja bolesnika postoje i razlike između genotipa i fenotipa bolesnika što upućuje na ulogu i nekih drugih faktora (osim mutacija gena CYP21). Jedan od takvih genetskih faktora mogao bi biti i broj ponavljanja CAG mikrosatelita koji se nalazi unutar gena za androgen receptor (5).

Prenatalna dijagnostika u obiteljima s KAH bolesnikom započela se provoditi još sredinom šezdesetih godina XX stoljeća i to u serološkom tipizacijom antigena HLA probanda odnosno bolesnog djeteta i roditelja. U slučaju da je fetus HLA identičan s bolesnikom, moglo se utvrditi da je i fetus bolestan. Međutim, metoda nije bila informativna u brojnim slučajevima kao što je smrt probanda,

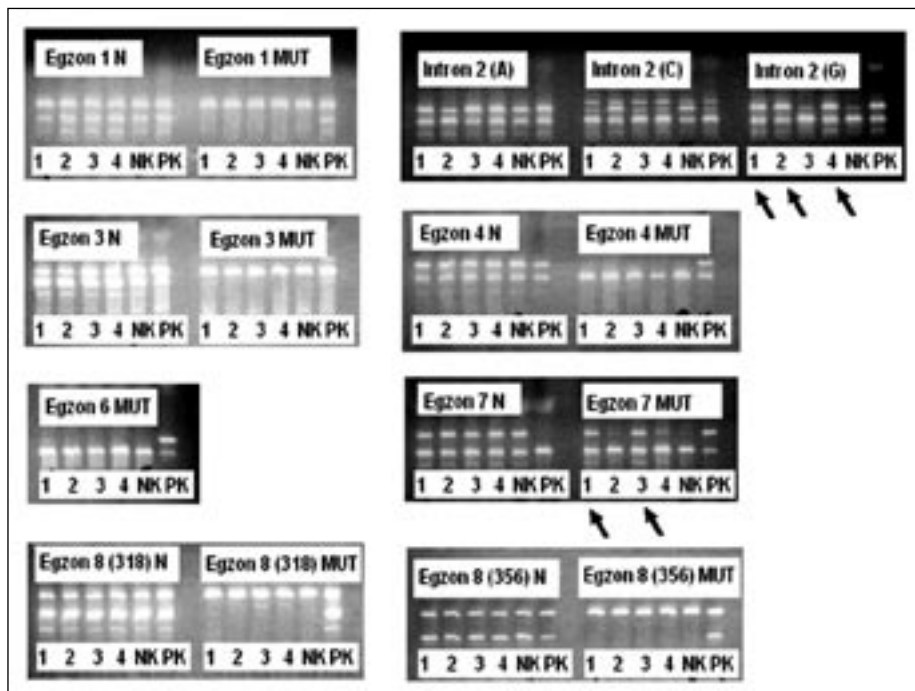
\*Klinički bolnički centar Zagreb  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Zavod za tipizaciju tkiva

Adresa za dopisivanje:  
Doc. dr. sc. Zorana Grubić  
Klinički bolnički centar Zagreb  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Zavod za tipizaciju tkiva  
10000 Zagreb, Kišpatićeva 12



Slika 1.  
Položaj gena *CYP21* i *CYP21P* unutar regije HLA na kraćem kraku kromosoma 6, te položaj 8 najčešćih mutacija

Figure 1  
The position of the *CYP21* and *CYP21P* genes within the HLA region on the short arm of chromosome 6, and the position of 8 most common mutations



U obitelji su otkrivene mutacije (označene strelicama) u intronu 2 (osobe 1, 2 i 4) i egzonu 7 (osobe 1 i 3); N-normalni alel; MUT-mutirani alel; 1-bolesnik; 2-majka; 3-otac; 4-brat; NK-negativna kontrola; PK-pozitivna kontrola

In the family were detected mutations (shown by the arrow) in the intron 2 (persons 1, 2 and 4) and exon 7 (persons 1 and 3); N-normal allele; MUT-mutant allele; 1-patient; 2-mother; 3-father; 4-brother; NK-negative ctrl; PK-pos ctrl

Slika 2.  
Primjer obitelji analizirane za 8 najčešćih mutacija gena *CYP21* metodom PCR-SSP

Figure 2  
Example of a family analysed for the 8 most common mutations of the *CYP21* gene by PCR-SSP

rekombinacija između lokusa HLA-B i HLA-DR ili homozigotnost jednog ili oba roditelja. Osim toga, serološka tipizacija HLA je vrlo složena i skupa metoda jer je neophodan dugotrajan (dva-tri tjedna) uzgoj amniocita.

Međutim, zadnjih dvadesetak godina prenatalna dijagnostika KAH-a izvodi se molekularnim metodama temeljenim na lančanoj reakciji polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction) bilo da se radi o neizravnim metodama (molekularna tipizacija HLA) ili o izravnom određivanju mutacija gena *CYP21*. Mutacije gena *CYP21* mogu se određivati hibridizacijom probama (sondama) specifičnim za svaku mutaciju, specifičnim početnicama (engl. primers) koje umnažaju pojedine mutacije ili pak sekvenciranjem gena i određivanjem slijeda parova baza (6). Sekvenciranje je najpreciznija metoda kojom se dobiva uvid u postojanje mutacija/e, ali se istovremeno mogu otkriti i nove mutacije što nije moguće s metodama temeljenim na specifičnim sondama, odnosno primerima. Prednost molekularnih metoda otkrivanja mutacija gena *CYP21* je i u tome što je potrebna mala količina uzorka, te nije potreban proband.

Na slici 2 prikazan je primjer obitelji koja je analizirana za 8 najčešćih mutacija gena *CYP21*. U obitelji su otkrivene dvije mutacije gena *CYP21* i to u intronu 2 (656 A/C - G) i egzonu 7 (V281L). Bolesnik je naslijedio mutaciju u intronu 2 od majke i mutaciju u egzonu 7 od oca. Brat je zdravi hetozigot jer je naslijedio samo jednu mutaciju u intronu 2 od majke.

#### LITERATURA

- White PC, Speiser PW. 2000 Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 245-91.
- Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Res Clin Endocrin & Metab* 2009; 23: 181-92.
- Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar MR, Najmabadi H, Saffari F, New MI. Ethnic Specific Distribution of Mutations in 716 Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia Owing to 21-Hydroxylase Deficiency. *Mol Genet Metab* 2007; 90: 414-21.

4. Krone N, Braun A, Roscher AA et al. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrin & Metab* 2000; 85: 1059-65.
5. Rocha RO, Billerbeck AE, Pinto EM et al. The degree of external genitalia virilization in girls with 21-hydroxylase deficiency appears to be influenced by the CAG repeats in the androgen receptor gene. *Clinical Endocrinology* 2008; 68: 226-32.
6. Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1635-40.

### *Summary*

#### MOLECULAR DIAGNOSIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

*Z. Grubić*

*Congenital adrenal hyperplasia is a monogenetic, autosomal disease which is caused in more than 90% of cases by 21-hydroxylase deficiency, or more specifically, by inactivating mutations of the CYP21 gene which codes the enzyme in question. The majority of the mutations is a result of recombination between active CYP21 gene and CYP21P pseudogene. The analysis of the CYP21 gene mutations is in most cases performed by polymerase chain reaction with specific primers.*

Descriptors: CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA, MOLECULAR DIAGNOSTICS, 21-HYDROXYLASE