

## MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA KAH-A ZBOG MANJKA 11-HIDROKSILAZE I 17-HIDROKSILAZE/17,20 LIAZE

KATARINA ŠTINGL\*

*Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je skupina autosomnih, recesivnih bolesti koje nastaju kao posljedica smanjene ili ukinute funkcije pojedinih enzima koji sudjeluju u sintezi kortizola. Jedan od ključnih postupaka u dijagnostici KAH-a je analiza mutacija gena koji su kodiraju ove enzime. Za razliku od KAH-a uzrokovanog nedostatkom 21-hidroksilaze koji predstavlja najučestaliji oblik bolesti (>90%) te je u najvećem broju slučajeva uzrokovan s relativno malim brojem mutacija gena CYP21A2, ostali oblici KAH-a se javljaju s puno manjom učestalošću, a mutacije gena koje su odgovorne za njihov nastanak su brojne, raspoređene čitavom dužinom gena te je stoga za njihovo određivanje neophodno sekvencioniranje čitave kodirajuće regije.*

Deskriptori: KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA, MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA, 11-HIDROKSILAZA, 17-HIDROKSILAZA/17,20 LIAZA

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) pripada skupini najčešćih nasljednih metaboličkih bolesti. Nastaje kao posljedica nedostatka jednog od četiri enzima koji su uključeni u sintezu kortizola (21-hidroksilaza, 11 $\beta$ -hidroksilaza, 17 $\alpha$ -hidroksilaza, 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza tip 2) ili P450 oksidoreduktaze, enzima koji služi kao donor elektrona steroidogen citokrom P450 (CYP) tip II enzimima. Svih pet oblika KAH-a su autosomne, recesivne bolesti, a geni s kojima su povezane poznati su i dobro opisani (Slika 1) (1).

Nedostatak 21-hidroksilaze predstavlja najčešći oblik KAH-a i zastupljen je u više od 90% slučajeva. Svi ostali oblici su zastupljeni u puno manjoj mjeri: nedostatak 11 $\beta$ -hidroksilaze odgovoran je za 5-8% slučajeva KAH-a, manjak 17 $\alpha$ -hidroksilaze je primijećen u svega 1% bolesnika s KAH-om dok se oblici KAH-a uzrokovani nedostatkom 3 $\beta$ -

hidroksisteroid dehidrogenaze tip 2 ili P450 oksidoreduktaze smatraju izuzetno rijetkima te za njih niti ne postoje podaci o incidenciji (2).

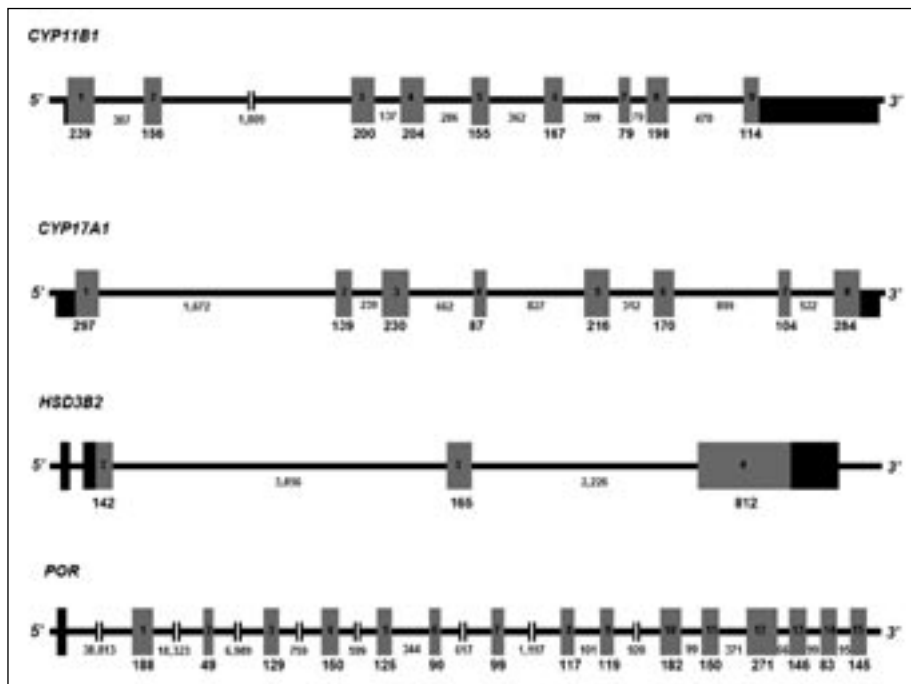
Incidencija KAH-a uzrokovanog manjkom 11 $\beta$ -hidroksilaze je 1 u 1000-00-200000 živorođene djece, s najvećom primijećenom stopom među židovskim imigrantima iz Maroka u Izraelu (1 u 5000-7000). Sam enzim 11 $\beta$ -hidroksilaza sudjeluje u završnom koraku sinteze kortizola - konverziji 11-deoksikortizola u kortizol, te također katalizira pretvorbu 11-deoksikortikosterona u kortikosteron. Do manjka enzima dolazi uslijed mutacija unutar gena CYP11B1 koji se nalazi na kromosomu 8 (8q21). Gen je sastavljen od devet egzona koji kodiraju protein od 503 aminokiseline. Istraživanja su pokazala kako se 50 do danas poznatih, inaktivirajućih mutacija ovog gena može pronaći duž čitave kodirajuće regije. Uglavnom radi o mutacijama koje dovode do promjene slijeda aminokiselina ili uvođenja stop kodona, no također su uočene i mutacije koje dovode do promjena u mjestima isijecanja introna iz glasničke RNK, male insercije ili delecije kao i složeni prerazmjestaji. Uglavnom se radi o mutacijama koje uzrokuju klasični oblik manjka 11 $\beta$ -hidroksilaze (3).

Premda je primijećeno kako se mutacije gena CYP11B1 nakupljaju u egzonomima 2, 6, 7 i 8, ne može se govoriti o tzv. "vrućim mjestima" kao što je to slučaj s genom CYP21A2 koji kodira enzim 21-hidroksilazu. U slučaju gena CYP21A2, inaktivacijske mutacije su u najvećem broju slučajeva delecija ili velika konverzija gena, delecija 8 parova baza u egonu 3 ili jedna od osam najčešćih točkastih mutacija. U samo u 3-5% slučajeva KAH-a uzrokovanog nedostatkom 21-hidroksilaze u pozadini se nalazi rijetka ili nova mutacija gena CYP21A2. Iz toga razloga se prilikom analize gena CYP11B1 kao metoda koristi izravno sekvencioniranje gena. Uglavnom se sam gen prije sekvencioniranja umnaža u tri odsječka kako bi se izbjeglo istovremeno umnažanje gena za aldosteron sintazu (CYP11B2) koji je od gena CYP11B1 udaljen oko 40kb i visoko mu je homologan (3).

Nedostatak 17 $\alpha$ -hidroksilaze predstavlja rijedak oblik KAH-a. Radi se o enzimu koji s jedne strane sudjeluje u 17 $\alpha$  hidroksilaciji pregnenolona i progesterona, dok s druge strane kao 17,20 liaza omogućava pretvorbu 17-hidroksi-pregnenolona u dehidropiandrosteron te u manjoj mjeri 17-hidroksi-progesterona u androstenedion.

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

Adresa za dopisivanje:  
Katarina Štingl, dipl. ing.  
Klinički bolnički centar Zagreb  
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku  
Zavod za tipizaciju tkiva  
10000 Zagreb, Kišpatićeva 12



Slika 1. Građa gena za 11 $\beta$ -hidroksilazu (CYP11B1), 17 $\alpha$ -hidroksilazu (CYP17A1), 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenazu tip 2 (H3D3B2) i P450 oksidoreduktazu (POR)

Figure 1  
The structure of the genes for 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1), 17 $\alpha$ -hydroxylase (CYP17A1), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (H3D3B2) and P450 oxidoreductase (POR)

Gen za 17 $\alpha$ -hidroksilazu/17,20 liazu (CYP17A1) se nalazi na kromosomu 10 (10q24.3), sastavljen je od osam egzona, a kodira protein od 508 aminokiselina. Do danas je opisano više od 70 mutacija koje dovode do inaktivacije gena CYP17A1. Kao i u slučaju gena za 11 $\beta$ -hidroksilazu, niti za ovaj gen nisu poznata vruća mjesta te je stoga u njegovoj analizi neophodno sekvencioniranje čitave kodirajuće regije. Jedinu iznimku u ovom pristupu predstavlja populacija Brazila kod koje je utvrđeno kako se u 82% slučajeva inaktivnog gena radi o dvije mutacije. U slučajevima kada je prisutan manjak samo 17,20 liaze, uzrok je pronađen u mutacijama koje dovode do promjene aminokiselina u onom dijelu proteinske molekule koji je odgovoran za interakciju s kofaktorom citokromom b5 (4).

Manjak 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tip 2 predstavlja još jedan rijedak oblik KAH-a. Enzim katalizira konverziju pregnenolona u progesteron, 17-hidroksipregnenolona u 17-hidroksi-pregesteron te dehidroepiandrosteron u androstenedion. Postoje dvije izoforme ovog enzima: tip 1 i tip 2, a kodiraju ih

geni HSD3B1 i HSD3B2. Nedostatak 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze tip 2 uzrokuju mutacije u genu HSD3B2 koji se nalazi na kromosomu 1 (1p13.1). Gen je sastavljen od četiri egzona od kojih se prevode samo egzoni 2, 3 i 4, a njegova analiza se provodi izravnim sekvencioniranjem nakon umnažanja uz pomoć lančane reakcije polimerazom (5).

Naposljetku, posljednji i vrlo rijetki oblik KAH-a predstavljaju bolesnici s nedostatkom P450 oksidoreduktaze. Ovaj oblik KAH-a je jedinstven budući se očituje kao kombinacija nedostatka 21-hidroksilaze i 17 $\alpha$ -hidroksilaze. Njegov mehanizam nastanka je razjašnjen otkrićem mutacija koje uzrokuju inaktivaciju gena za P450 oksidoreduktazu - enzima koji je neophodan za funkciju 21-hidroksilaze i 17 $\alpha$ -hidroksilaze. Gen za ovaj enzim (POR) je smješten na kromosomu 7 (7q11.2), sastoji se od 15 egzona, a sam protein je građen od 680 aminokiselina. Mutacije koje dovode do ukidanja aktivnosti gena POR pripadaju mutacijama koje dovode do promjene slijeda aminokiselina, pomaka okvira čitanja kao i promjene mjesta isijecanja

introna iz glasničke RNK, te su raspoređene duž čitavog gena bez očitih vrućih mjesta kao i u slučajevima gena CYP11B1, CYP17A1 i HSD3B2. Iz tog razloga se i u slučaju analize POR gena u svrhu pronalaska inaktivirajućih mutacija koristi umnažanje gena uz pomoć lančane reakcije polimerazom praćeno izravnim sekvencioniranjem (6).

Genetska analiza je u većini slučajeva uobičajeni dio postupka u dijagnostici KAH-a. Budući je poznato kako postoji vrlo snažna korelacija između genotipa i fenotipa za sve oblike KAH-a s izuzetkom oblika koji je povezan s nedostatkom P450 oksidoreduktaze, određivanje mutacija gena koje kao posljedicu imaju smanjenje funkcije enzima ili njeno potpuno ukidanje, od izrazite je pomoći u dijagnostici ove bolesti.

#### LITERATURA

- White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Reviews* 2000; 21: 245-91.
- Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009; 23: 181-92.
- Mornet E, Dupont J, Vitek A et al. Characterization of two genes encoding human steroid 11 beta-hydroxylase (P-450(11)beta). *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264: 20961-7.
- Geller DH, Auchus RJ, Mendonca BB, Miller WL. The genetic and functional basis of isolated 17,20-lyase deficiency. *Nature Genetics* 1997; 17: 201-5.
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. Molecular biology of the 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase gene family. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 525-82.
- Krone N, Dhir V, Ivison HE, Arlt W. Congenital adrenal hyperplasia and P450 oxidoreductase deficiency. *Clinical Endocrinology* 2007; 66: 162-72.

*Summary*

MOLECULAR DIAGNOSIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 11-HYDROKSYLAZE  
AND 17-HYDROKSYLAZE/17,20 LYASE DEFICIENCY

*K. Štingl*

*Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of autosomal, recessive disorders which occur as a consequence of reduced or completely abolished function of some of the enzymes which participate in the cortisol synthesis. One of the key procedures in the diagnostics of CAH is mutation analysis of the genes which code these enzymes. As opposed to the 21-hydroxylase deficiency which represents the most common form of CAH (>90%) and is, in the majority of cases, caused by a relatively small number of mutations of CYP21A2 gene, the remaining forms of CAH occur with a much lower frequency and the mutations of the genes responsible for disease development are numerous and distributed throughout the genes which therefore requires the sequencing of the entire coding regions in their determination.*

Descriptors: CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA, MOLECULAR DIAGNOSTICS, 11-HYDROXYLASE, 17- HYDROXYLASE/17,20 LYASE