

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Iva D. Milačić

**MOLEKULARNO-GENETIČKA OSNOVA
KONGENITALNE ADRENALNE
HIPERPLAZIJE U SRBIJI:
KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U
CYP21A2 GENU**

doktorska disertacija

Beograd, 2017

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Iva D. Milačić

**MOLECULAR-GENETIC BASIS OF
CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA
IN SERBIA: CHARACTERIZATION OF
MUTATIONS IN *CYP21A2* GENE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI

dr Milena Ugrin, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Sonja Pavlović, naučni savetnik, Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

KOMISIJA

dr Mihailo Jelić, docent, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Datum odbrane: _____2017. godine

ZAHVALNICA

Doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za molekularnu biomedicinu na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu.

Zahvaljujem se dr Sonji Pavlović što me je srdačno primila u svoj istraživački tim i omogućila sticanje neprocenjivog znanja.

Dr Maji Stojiljković zahvaljujem što je omogućila da tezu uradim u pomenutoj laboratoriji i što je od početka do kraja ekspeditivno vodila projekat zvani „KAH”.

Dr Mileni Ugrin, svom mentoru, zahvaljujem na pomoći pri eksperimentalnom radu i sugestijama koje su doprinele izradi teze.

Dr Mihailu Jeliću želim da zahvalim na dragocenoj pomoći, daleko većoj nego što je bila očekivana, kako prilikom sticanja uslova za doktoriranje, tako i prilikom pisanja teze.

Zahvaljujem se na korisnim savetima i pomoći u eksperimentalnom radu svim članovima Lab-a 01, a posebno Aniti i Kristel.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici.

MOLEKULARNO-GENETIČKA OSNOVA KONGENITALNE ADRENALNE HIPERPLAZIJE U SRBIJI: KARAKTERIZACIJA MUTACIJA U *CYP21A2* GENU

SAŽETAK

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) obuhvata grupu autozomno recesivnih oboljenja okarakterisanih narušenom sintezom steroidnih hormona u kori nadbubrežne žlezde i širokim spektrom kliničkih simptoma. Na osnovu fenotipske ekspresije razlikuju se klasična (jednostavna virilizujuća i forma sa gubitkom soli) i neklasična forma bolesti. U više od 90% slučajeva javlja se zbog deficijencije enzima steroid 21-hidroksilaze (*CYP21A2*) kao posledice prisustva mutacija u *CYP21A2* genu. Dva osnovna mehanizma dovode do inaktivacije *CYP21A2* gena: nejednaka razmena delova homologih sekvenci između nesestrinskih hromatida u mejozi može dovesti do formiranja *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena ili delecije celog *CYP21A2* gena, dok se putem genske konverzije u aktivan gen kopiraju homologe, ali defektne sekvence *CYP21A1P* pseudogena. Zbog varijabilnosti i kompleksne strukture regiona u kome je lociran *CYP21A2* gen molekularna dijagnostika KAH-a i danas predstavlja izazov.

Ovo je prva studija molekularno-genetičke osnove KAH-a u Srbiji. Izvršena je optimizacija PCR-SSP i metode direktnog DNK sekvenciranja *CYP21A2* gena čime je omogućena detekcija *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena, mutacija nastalih genskom konverzijom, ali i retkih i novih genetičkih varijanti. Utvrđen je celokupan spektar mutacija kao i njihove učestalosti kod 61 nesrodnog pacijenta. Identifikovano je 18 alela sa patogenim efektom i dostignut je nivo detekcije mutacija od 82,0%. Nivo detekcije je bio najviši (94,7%) u grupi pacijenata sa najtežom formom bolesti (klasični KAH sa gubitkom soli).

Najučestalija mutacija u populaciji iz Srbije, kao i u većini drugih populacija, je c.290-13A/C>G (18,5%). Pet učestalih alela koji uključuju c.290-13A/C>G, *CYP21A1P/CYP21A2*, p.P30L, p.R356W i p.G110fs mutacije čine 63,0% svih mutiranih *CYP21A2* alela u analiziranoj grupi pacijenata. Primećena je neuobičajeno visoka učestalost

p.R356W mutacije (11,1%), kao i kompleksnih alela sa višestrukim mutacijama (7,4%), među kojima čak 75,0% sadrži p.P453S mutaciju. Direktnim sekvenciranjem su identifikovane i dve nove *missense* mutacije, p.L129P i p.S165P, za koje je kompjuterskim predikcijama pokazano da su verovatno patogene. Kod većine pacijenata (74,0%) uočena je pozitivna korelacija između genotipa *CYP21A2* gena i fenotipa KAH-a, mada je varijabilnost u kliničkoj slici primećena u slučaju mutacija c.290-13A/C>G i p.P30L, dok je mutacija p.P453S neočekivano pokazala korelaciju sa klasičnom formom KAH-a.

Na samom kraju, zahvaljujući optimizovanim metodama i uzimajući u obzir spektar i učestalosti detektovanih mutacija razvijen je optimalan algoritam za rutinsku molekularno-genetičku dijagnostiku kongenitalne adrenalne hiperplazije uzrokovane deficijencijom steroid 21-hidroksilaze u Srbiji, koji ima za cilj da omogući preciznu identifikaciju *CYP21A2* varijanti i postavljanje tačne dijagnoze bolesti.

Ključne reči: deficijencija steroid 21-hidroksilaze, *CYP21A2* gen, detekcija mutacija, *CYP21A1P/CYP21A2* himerni geni, genotip-fenotip korelacija, dijagnostički algoritam

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: 575.224.2:[616-008.6:616.453]

MOLECULAR-GENETIC BASIS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA IN SERBIA: CHARACTERIZATION OF MUTATIONS IN *CYP21A2* GENE

SUMMARY

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) comprises of group of autosomal recessive disorders characterized by impaired adrenal steroidogenesis and wide spectrum of clinical manifestations. There are two main phenotypes: classical (salt wasting and simple virilizing) and non-classical form. In more than 90% of patients the disease is caused by steroid 21-hydroxylase (*CYP21A2*) deficiency resulting from underlying *CYP21A2* gene mutations. Two major molecular mechanisms lead to *CYP21A2* gene inactivation: unequal *crossing over* results in *CYP21A1P/CYP21A2* chimerae formation or whole *CYP21A2* gene deletion, whereas gene conversion copy homologue, but defective sequences from *CYP21A1P* pseudogene to the active gene. Due to variability and complex structure of the region where *CYP21A2* gene resides molecular diagnostics of congenital adrenal hyperplasia remains a challenge.

This is a first comprehensive study regarding molecular genetic basis of CAH in Serbia. Optimization of PCR-SSP and direct DNA sequencing of *CYP21A2* gene was conducted, thus enabling detection of *CYP21A1P/CYP21A2* chimerae, pseudogene derived mutations, but also rare and new genetic variants. Analysing 61 unrelated patients complete mutational spectrum, as well as mutation's frequencies, was determined. Eighteen pathogenic alleles were identified and detection rate of 82.0% was assessed. Detection rate was highest (94.7%) in patients with severe classical form with salt wasting.

The most frequently occurring mutation in patients from Serbia, as well as in many other populations, is c.290-13A/C>G (18.5%). Five alleles including c.290-13A/C>G, *CYP21A1P/CYP21A2*, p.P30L, p.R356W and p.G110fs mutations account for 63.0% of all mutated *CYP21A2* alleles in analysed patients. Unusually, high frequency of p.R356W mutation (11.1%), as well as complex alleles with multiple mutations (7.4%), most frequently including p.P453S (75.0%), was detected. Direct DNA sequencing unravelled

two new *missense* mutations p.L129P and p.S165P, for which computer predictions showed to be probably pathogenic. In majority of patients (74.0%) positive correlation between *CYP21A2* genotype and CAH phenotype was noted, although clinical variability was noticed in relation to c.290-13A/C>G and p.P30L mutations, whereas p.P453S mutation was unexpectedly related to classical CAH form.

Finally, using optimized methodology and based on spectrum and frequencies of detected mutations an optimal algorithm for routine molecular genetic diagnostics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency was designed, thus enabling precise identification of *CYP21A2* variants and correct diagnosis assessment in CAH affected patients in Serbia.

Key words: steroid 21-hydroxylase deficiency, *CYP21A2* gene, mutation detection, *CYP21A1P/CYP21A2* chimerae, genotype-phenotype correlation, diagnostic algorithm

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

UDC number: 575.224.2:[616-008.6:616.453]

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.2. DEFICIJENCIJA STERIOD 21-HIDROKSILAZE.....	3
1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA DEFICIJENCIJE 21-HIDROKSILAZE	3
1.2.2. PATOGENEZA DEFICIJENCIJE 21-HIDROKSILAZE	4
1.2.3. TIPOVI KAH-A UZROKOVANI DEFICIJENCIJOM 21-HIDROKSILAZE.....	8
1.2.3.1. KLASIČNE FORME KAH-A	8
1.2.3.1.1. KLASIČNA FORMA SA GUBITKOM SOLI.....	9
1.2.3.1.2. JEDNOSTAVNA VIRILIZUJUĆA FORMA	10
1.2.3.2. NEKLASIČNA FORMA	10
1.2.3.3. JEDNOSTAVNI HETEROZIGOTI	11
1.2.4. STERIOD 21-HIDROKSILAZA (CYP21A2).....	12
1.2.5. CYP21 GENI.....	15
1.2.5.1. STRUKTURA CYP21 GENA	15
1.2.5.2. GENOMSKA ORGANIZACIJA CYP21A2 GENSKOG LOKUSA.....	16
1.2.6. MUTACIJE U CYP21A2 GENU	17
1.2.6.1. MUTACIJE NASTALE PROCESOM GENSKE KONVERZIJE	17
1.2.6.2. MUTACIJE NASTALE NEJEDNAKOM RAZMENOM DELOVA HOMOLOGIH SEKVENCI	20
1.2.6.3. RETKE I DE NOVO MUTACIJE.....	23
1.2.6.4. FENOTIPSKI NEUTRALNE VARIJANTE U CYP21A2 GENU	24
1.2.7. GENOTIP-FENOTIP KORELACIJA	24
1.3. OBLICI KAH-A INDUKOVANI DRUGIM STERIOGENIM ENZIMIMA	27
1.4. KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA U SRBIJI.....	28
2. CILJ RADA	29
3. MATERIJAL I METODE	31
3.1. MATERIJAL.....	32
3.1.1. PACIJENTI.....	32
3.1.2. PRAJMERI	32
3.2. METODE.....	35
3.2.1. IZOLACIJA DNK.....	35
3.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE.....	35
3.2.3. ANALIZA DNK NA AGAROSNOM GELU	36
3.2.4. PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKTA NA KOLONI.....	37
3.2.5. AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK.....	37
3.2.6. DETEKCIJA HIMERNIH CYP21A1P/CYP21A2 GENA PCR-SPECIFIČNOM REAKCIJOM (PCR-SSP).....	39
3.2.7. IN SILICO ANALIZA	41
4. REZULTATI	42
4.1. MUTACIJE U CYP21A2 GENU.....	43
4.1.1. DETEKCIJA MUTACIJA CYP21A2 GENA.....	43
4.1.2. DETEKCIJA HIMERNIH CYP21A1P/CYP21A2 GENA	46

4.1.3. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U <i>CYP21A2</i> GENU	50
4.1.4. NOVE VARIJANTE U <i>CYP21A2</i> GENU	54
4.2. KORELACIJA GENOTIPA <i>CYP21A2</i> GENA I FENOTIPA KAH-A	57
5. DISKUSIJA	61
5.1. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U GENU <i>CYP21A2</i> KOD PACIJENATA OBOLELIH OD KAH-A U SRBIJI	62
5.2. KOMPLEKSNI ALELI SA VIŠE MUTACIJA	67
5.3. NOVE VARIJANTE p.L129P i p.S165P U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA <i>CYP21A2</i>	68
5.4. STOPA DETEKCIJE MUTACIJA	69
5.5. KORELACIJA GENOTIP-FENOTIP	71
5.6. ALGORITAM ZA OPTIMALNU MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU KAH-A U SRBIJI	74
6. ZAKLJUČCI	77
7. LITERATURA	80
Biografija autora	95
Izjava o autorstvu	96
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	97
Izjava o korišćenju	98

1. UVOD

1.1. KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA (KAH)

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) je jedan od najučestalijih naslednih metaboličkih poremećaja sa izuzetno komplikovanom genetičkom dijagnozom. Obuhvata grupu autozomno recesivnih oboljenja izazvanih potpunim gubitkom ili smanjenom aktivnošću jednog od pet enzima neophodnih za biosintezu steroidnih hormona u nadbubrežnoj žlezdi. Prvi štampani izveštaj o pacijentu sa KAH-om dao je italijanski anatom Luigi de Crecchio (New, 2011) u 19-tom veku i sve do ranih 50-tih godina prošlog veka kada je uvedena adekvatna terapija, ovaj uobičajeni uzrok poremećaja polnog razvoja je bio smrtonosan. Fundamentalni defekt pacijenata sa KAH-om je nemogućnost adekvatne sinteze glukokortikoida kortizola u kori nadbubrežne žlezde. Sinteza kortizola se vrši u pet ključnih enzimatski katalizovanih reakcija i deficijencija bilo kojeg od enzima rezultuje narušenom sintezom pomenutog steroidnog hormona. Nedovoljna sinteza kortizola putem mehanizma negativne povratne sprege signalizira hipotalamusu i hipofizi da povećaju lučenje kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) i adrenokortikotropnog hormona (ACTH) što dovodi do hronične stimulacije kore nadbubrežne žlezde i njene posledične hiperplazije. Osim toga, biosinteza mineralokortikoida aldosterona takođe može biti narušena, a zbog deficijencije specifičnog enzima javlja se sintetički blok koji dovodi do nagomilavanja steroidnih prekursora i njihovog preusmeravanja u neinhibirani put biosinteze polnih hormona. Kao posledica hiperandrogenizma javlja se prenatalna virilizacija spoljnjih genitalija fetusa ženskog pola odnosno ženski pseudohermafroditizam. Pored ove prepoznatljive kliničke manifestacije bolesti, nedostatak kortizola i aldosterona izaziva širok spektar kliničkih simptoma. Na osnovu fenotipske ekspresije razlikuju se teška klasična i blaga neklasična forma. Standardni medicinski tretman bolesti podrazumeva dugotrajnu oralnu primenu glukokortikoida i mineralokortikoida u cilju kompenzacije njihovog nedostatka i supresije sinteze polnih hormona (Riepe i sar., 2007), dok je većini ženskih pacijenata sa težim oblikom bolesti neophodna i hirurška korekcija spoljnjih genitalija. Postoji više formi KAH-a uzrokovanih različitim enzimatskim defektima pri čemu svaku karakteriše jedinstveni hormonski profil i odgovarajuća

klinička slika. U više od 90% slučajeva uzrok kongenitalne adrenalne hiperplazije je deficijencija enzima steroid 21-hidroksilaze (CYP21A2) koja je posledica mutacija u *CYP21A2* genu (White i sar., 2000).

1.2. DEFICIJENCIJA STEROID 21-HIDROKSILAZE

1.2.1. EPIDEMIOLOGIJA DEFICIJENCIJE 21-HIDROKSILAZE

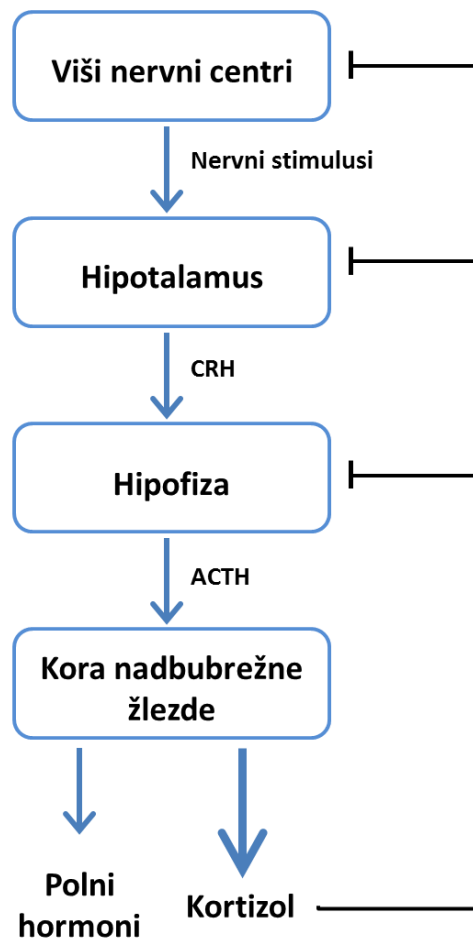
Kongenitalna adrenalna hiperplazija uzrokovana deficijencijom 21-hidroksilaze (OMIM #201910) se javlja širom sveta. U mnogim razvijenim zemljama tokom poslednje dve decenije skrining na deficijenciju 21-hidroksilaze je uključen u neonatalni skrining program čime su obezbeđeni precizniji podaci o distribuciji i učestalosti ovog oboljenja u različitim populacijama i geografskim regionima. Procene o ukupnoj učestalosti bolesti variraju od 1:10000 do 1:20000, dok procenjena prosečna učestalost karakteristična za Evropu iznosi 1:13635 (Loeber, 2007). Podaci neonatalnog skrining programa dostupni iz nekoliko azijskih zemalja ukazuju na nižu učestalost klasične forme KAH-a na ovom kontinentu (Japan 1:21000, Tajvan 1:28000) (Mikami i sar., 1999; Lee i sar., 2000), a značajno niža učestalost je nađena i kod Afroamerikanaca u SAD-u (1:42000) (Therrel i sar., 1998). Suprotno tome, najviše detektovane učestalosti klasične forme KAH-a su prijavljene u dve geografski izolovane populacije, kod Jupiko Eskima sa Aljaske (1:282) i stanovništva francuskog ostrva La Reunion (1:2100) (Pang i sar., 1982; Pang i sar., 1988), dok je viša učestalost detektovana i u Brazilu (1:7500) (Pang i sar., 1993) i na Filipinima (1:8400) (Padilla i sar., 2003). Iako neonatalni skrining često ne detektuje neklasičnu formu bolesti, zbog čega su podaci o njenoj učestalosti nepotpuni, procenjuje se da je ona učestalija od klasične forme (1:1000-1:2000 kod kavkazijanaca) (Trapp i Oberfield., 2012), kao i da ta učestalost varira u zavisnosti od geografskog područja (Speiser i sar., 1985; Wilson i sar., 2007). Najveća učestalost neklasične forme bolesti je nađena kod Aškenazi Jevreja (1:27), zatim kod Latinoamerikanaca (1:53), naroda bivše Jugoslavije (1:63) i Italijana (1:333) (Speiser i sar., 1985). Učestalost neklasične forme kod žena sa hirzutizmom (pojačanom maljavošću) i dece sa prevremnim pubertetom je veća ili jednaka 10% u svim studijama

bez obzira na populaciju, dok u grupi infertilnih muškaraca nije zapažena veća učestalost ovog oboljenja (Ojeifo i sar., 1984).

1.2.2. PATOGENEZA DEFICIJENCIJE 21-HIDROKSILAZE

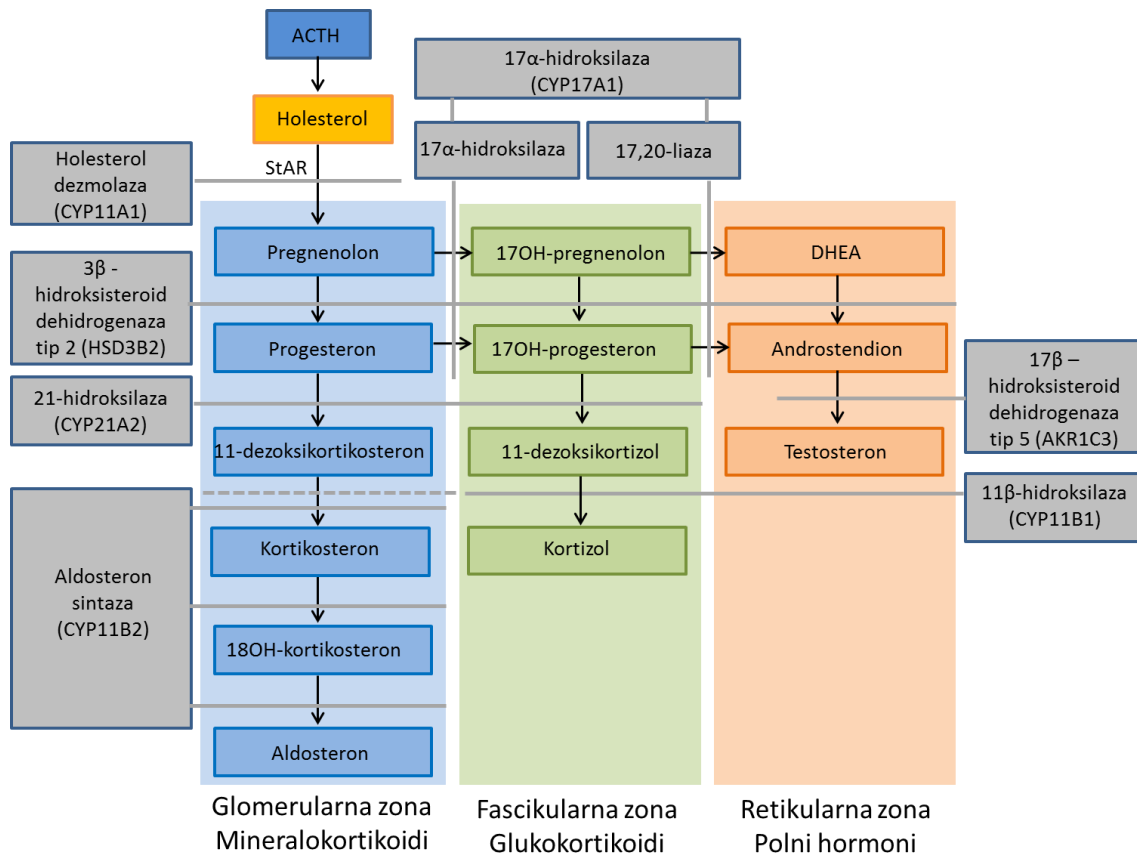
U kori nadbubrežne žlezde se od zajedničkog prekursora holesterola sintetisu tri klase steroidnih hormona: glukokortikoidi, mineralokortikoidi i polni hormoni. Svaka od ovih klasa se sintetise u histološki i funkcionalno zasebnom delu žlezde. Glukokortikoid kortizol, glavni produkt središnje fascikularne zone, reguliše metabolizam ugljenih hidrata i ima važnu ulogu u borbi protiv infekcija, u uslovima stresa i traume. Aldosteron, krajnji produkt sinteze mineralokortikoida, produkuje se u spoljašnjoj glomerularnoj zoni i reguliše balans elektrolita pomažući reapsorpciju natrijuma iz bubrega, debelog creva i znojnih žlezda. Kora nadbubrežne žlezde predstavlja i sekundarno mesto produkcije polnih hormona. Hormone dehidroepiandrosteron (DHEA), androstendion i testosteron luče fascikularna i unutrašnja retikularna zona.

Biosinteza steroidnih hormona je zavisna od prisutnih enzima i pod kontrolom je hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose (slika 1). Nervni stimulusi CNS-a stimulišu sintezu i lučenje kortikotropin-oslobađajućeg hormona (CRH) hipotalamusa koji sa svoje strane stimuliše sintezu i lučenje adrenokortikotropnog hormona (ACTH) prednjeg režnja hipofize (Itoi i sar., 1998). ACTH se zatim vezuje za receptore na površini adrenokortikoidnih ćelija kore nadbubrežne žlezde što rezultuje unosom holesterola na matriksnu stranu mitohondrija i sintezom i lučenjem steroidnih hormona. Cirkulišući kortizol putem mehanizma negativne povratne sprege inhibira hipotalamus i hipofizu čime smanjuje lučenje CRH i sintezu ACTH. Na produkciju steroidnih hormona utiče i stres, kao i brojni metabolički i fizički faktori (White i sar., 2000).



Slika 1. Hipotalamo-hipofizno-adrenalna osa (preuzeto i modificovano iz Genetic Steroid Disorders, 2014).

Zajednički prekursor kolesterol se ili *de novo* produkuje u kori nadbubrežne žlezde ili biva transportovan u formi LDL kolesterola. Steroidogeni akutni regulatorni protein (StAR) posreduje u transportu kolesterola kroz mitohondrijsku membranu, nakon čega se nizom reakcija katalizovanih od strane različitih enzima kolesterol metaboliše u tri glavna biosintetička puta (slika 2). Prvi i ograničavajući enzimatski korak je konverzija kolesterola u pregnenolon koji je supstrat za više različitih enzima i prekursor za sintezu sve tri klase steroidnih hormona.



Slika 2. Shematski prikaz biosintetičkih puteva mineralokortikoida, glukokortikoida i polnih steroidnih hormona u kori nadbubrežne žlezde (preuzeto i modifikovano iz Han i sar., 2014).

Steroid 21-hidroksilaza katalizuje konverziju 17-OH progesterona (17-OHP) u 11-dezoksikortizol u putu sinteze glukokortikoida i progesterona u 11-dezoksikortikosteron u putu sinteze mineralokortikoida. Smanjena aktivnost ovog enzima redukuje sintezu kortizola, otvara negativnu povratnu spregu, dovodi do kompenzatornog povećanja sinteze CRH i ACTH i hronične stimulacije i hiperplazije kore nadbubrežne žlezde. Zbog postojanja sintetičkog bloka u kori nadbubrežne žlezde, kao i u cirkulaciji, dolazi do akumulacije prekursora progesterona, 17-OH pregnenolona i 17-OH progesterona, karakterističnog biohemijskog obeležja koje je upotrebljeno za samu dijagnozu bolesti. Kako za biosintezu polnih hormona u retikularnoj zoni nije neophodna steroid 21-hidroksilaza nagomilani 17-OHP biva usmeren u ovaj

biosintetički put što rezultuje povećanom sintezom polnih hormona. Sinteza mineralokortikoida zahteva minimalnu rezidualnu aktivnost enzima pa se odsustvo aldosterona javlja samo u slučaju najteže forme bolesti. Opšti biohemijski profil kongenitalne adrenalne hiperplazije izazvane deficijencijom steroid 21-hidroksilaze podrazumeva biosintetičku blokadu kortizola i aldosterona, a preteranu stimulaciju biosinteze polnih steroidnih hormona. Deficijencije steroid 11 β -hidroksilaze (CYP11B1), 17 α -hidroksilaze (CYP17A1), 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2 (HSD3B2) i P450 oksidoreduktaze karakterišu specifični hormonski profili koji su rezultat odgovarajućih katalitičkih zastoja u biosintezi steroidnih hormona u kori nadbubrežne žlezde (Krone i Arlt., 2009).

Dijagnoza bolesti se postavlja merenjem bazalne koncentracije 17-OHP u folikularnoj fazi i 60 min nakon intravenskog ubrizgavanja sintetičkog ACTH (Synacthen test). Iako izvestan stepen preklapanja postoji, na osnovu ovih vrednosti je moguće razlikovati zdrave individue, heterozigote i različite varijante KAH-a. Adekvatan tretman bolesti je zasnovan na supstitucionoj terapiji mineralokortikoidima koji uspostavljaju balans elektrolita i glukokortikoidima koji koriguju deficijenciju lučenja kortizola i suprimiraju preteranu produkciju ACTH (^aNew i sar., 2014) i polnih hormona. Time je sprečena dalja virilizacija i omogućen normalan rast i razvoj. Ukoliko se genitalna virilizacija već desila, moguća je hirurška korekcija. Iako je prenatalni tretman obolelih ženskih fetusa u cilju sprečavanja genitalne virilizacije moguć, zbog brojnih kontraindikacija smatran je kontroverznim, te ne predstavlja standardnu medicinsku negu već eksperimentalnu proceduru (^bNew i sar., 2014). Tretman podrazumeva uvođenje deksametazona u prvom trimestru (oko devete nedelje gestacije), pre nego što započne genitalna organogeneza. Od 10 do 13 nedelje se zatim vrši biopsija horionskih resica radi dobijanja tkiva za analizu kariotipa, kao i za molekularno-genetičku analizu. Tretman biva prekinut kod muških i zdravih ženskih fetusa, a nastavlja se do termina kod obolelih ženskih fetusa. Nedavno istraživanje (^bNew i sar., 2014) je prijavilo i strategiju za prenatalno testiranje fetusa analizom slobodne fetalne DNK (eng. cell-free fetal DNA, cffDNA) iz seruma majke. Osim neinvazivnosti osnovna prednost ovakvog testiranja je mogućnost dobijanja rezultata pre devete nedelje gestacije čime je omogućeno da terapija bude uvedena isključivo kod obolelih ženskih fetusa.

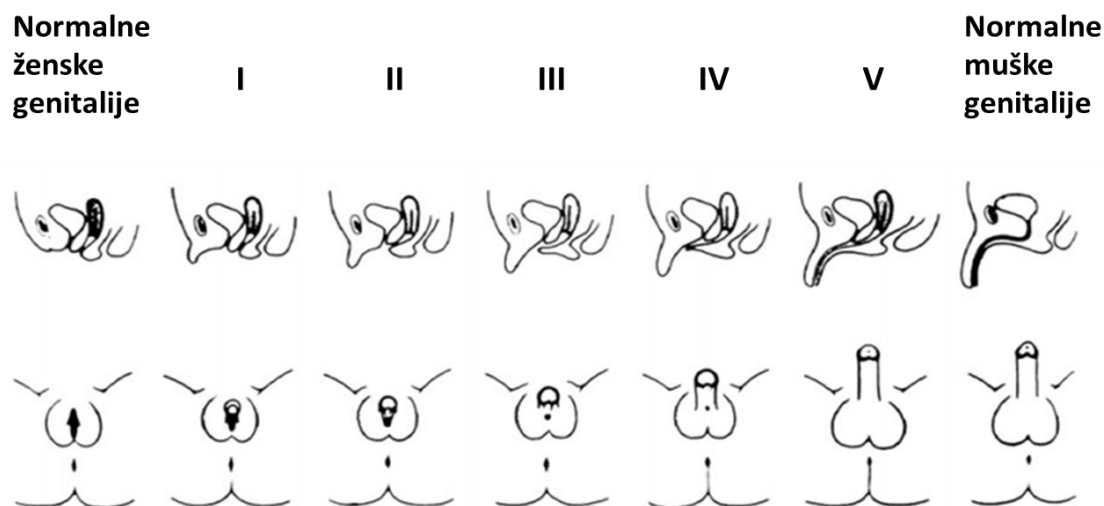
1.2.3. TIPOVI KAH-A UZROKOVANI DEFICIJENCIJOM 21-HIDROKSILAZE

Iako je KAH sa kliničkog aspekta ispravnije posmatrati kao kontinuum fenotipova, iz praktičnih razloga je izvršena klasifikacija u diskretne fenotipske kategorije. U zavisnosti od stepena enzimatskog defekta kongenitalna adrenalna hiperplazija se može klasifikovati u dve forme: klasična forma (sa gubitkom soli i jednostavna virilizujuća forma) i neklasična forma. Dijagnoza različitih varijanti bolesti se postavlja kliničkom, hormonskom i molekularno-genetičkom analizom. Međutim, iako je ovakva klasifikacija praktična, razlikovanje između formi nije uvek jednostavno.

1.2.3.1. KLASIČNE FORME KAH-A

Klasične forme bolesti su po definiciji okarakterisane prisustvom ambivalentnih genitalija kod ženskih fetusa i uglavnom se dijagnostifikuju po rođenju. Biohemijski profil pacijenata podrazumeva akumulaciju steroidnih prekursora pre enzimatskog bloka, preteranu sintezu polnih hormona, nedostatak kortizola, a u najtežem obliku i nedostatak aldosterona. Deficit glukokortikoida utiče na metabolizam ugljenih hidrata i uzrokuje slabu srčanu radnju, a hipoglikemija u prvoj godini života može ostaviti teške neurološke posledice ili čak dovesti do letalnog ishoda (Jääskeläinen i Voutilainen, 2000; Pinto i sar., 2003). Izlaganje ženskih fetusa visokim koncentracijama testosterona tokom perioda kritičnog za polnu diferencijaciju (9-15 nedelja intrauterinog razvoja) dovodi do maskulinizacije spoljnjih genitalija pri čemu se unutrašnji reproduktivni organi (jajnici, materica i jajovodi) razvijaju normalno (Merke i Bornstein, 2005). Stepem maskulinizacije spoljnjih genitalija je varijabilan i klasifikovan u pet Praderovih stupnjeva počev od jednostavne klitoromegalije (stadijum I, slika 3) do muškog fenotipa sa razvijenim penisom i bilateralnom kriptorhidijom (stadijum V) (Prader, 1954). Kod muških fetusa visoke koncentracije testosterona ne utiču značajno na diferencijaciju pola.

Osim fundamentalnih abnormalnosti u sintezi steroidnih hormona kore nadbubrežne žlezde, zbog razvojnih defekata u njenom nastanku, funkcija srži je takođe poremećena što rezultuje smanjenom sintezom kateholamina, pre svega epinefrina (Merke i sar., 2000).



Slika 3. Dijagrami normalne ženske i muške anatomije spoljnjih genitalija kao i različiti prelazni stupnjevi polne ambivalentnosti klasifikovani prema Praderovoj skali.

1.2.3.1.1. KLASIČNA FORMA SA GUBITKOM SOLI

Klasična forma sa gubitkom soli (eng. *Salt Waisting*, SW) predstavlja najteži oblik bolesti i čini 75% slučajeva klasične forme KAH-a (New i Wilson, 1999). Pored nedostatka kortizola i znakova hiperandrogenizma prisutno je i nedovoljno lučenje mineralokortikoida aldosterona. Aldosteron je ključan za održavanje normalne homeostaze natrijuma i njegov nedostatak rezultuje gubitkom natrijuma putem bubrega, debelog creva i znojnih žlezda (Funder, 1993). Kod obolelih se javlja hiponatremija, hiperkalemija, hiper-reninemija, dehidracija i hipovolemični šok u 1-4 nedelji života, a novorođenčad karakteriše i slab apetit, gubitak težine, povraćanje, letargija. Ukoliko pacijent ne dobije pravovremenu medicinsku negu, adrenalne krize u neonatalnom periodu koje se javljaju kao posledica deficijencije aldosterona mogu biti fatalne. Posebno su ugroženi dečaci jer kod njih ne postoje dvoznačne genitalije koje bi signalizirale postojanje bolesti pre pojave dehidracije i šoka (Concolino i sar., 2010). Step en genitalne maskulinizacije nije u korelaciji sa težinom bolesti, te čak i blago virilizovani ženski fetusi mogu imati ovu formu bolesti i moraju biti pažljivo praćeni tokom prvih nedelja života (New i sar., 2014). Sa druge strane pacijenti koji nemaju

najteži oblik KAH-a takođe mogu imati visok stepen genitalne maskulinizacije (Wilson i sar., 1995; Krone i sar., 2000).

1.2.3.1.2. JEDNOSTAVNA VIRILIZUJUĆA FORMA

Pacijenti sa adekvatnom sintezom aldosterona i normalnim balansom elektrolita, a kod kojih su prisutni znaci prenatalne virilizacije, boluju od klasične jednostavne virilizujuće forme (eng. *Simple virilizing form*, SV). Različit stepen virilizacije spoljnjih genitalija je prisutan kod devojčica, dok se kod dečaka bolest manifestuje kao prevremeni pubertet. Kod ženskih pacijenata zbog prisustva ambivalentnih genitalija dijagnoza se postavlja uskoro po rođenju, dok je kod dečaka prisutna samo hiperpigmentacija i dijagnoza obično kasni nekoliko godina do pojave znakova hiperandrogenizma (Merke i Bornstein, 2005). Karakterističan je brz somatski rast u detinjstvu, a zbog povišenog nivoa polnih hormona dolazi i do rane epifizealne fuzije koja rezultuje niskim rastom u adultnom dobu. Zakasnela dijagnoza i odsustvo odgovarajuće terapije glukokortikoidima kod devojčica za posledicu ima progresivnu virilizaciju (New i sar., 2014).

1.2.3.2. NEKLASIČNA FORMA

Neklasična forma KAH-a (eng. *Nonclassic form*, NC) poznata i kao „late-onset” je obično blaga i dijagnostifikuje se tek kasnije u životu. Parcijalna aktivnost steroid 21-hidroksilaze omogućava dovoljnu sintezu kortizola i aldosterona, ali je prisutno blago do umereno povećanje sinteze polnih hormona. Pacijenti su na rođenju asimptomatični, bez virilizacije, a primarni simptomi se javljaju kao varijabilni znaci povećanog lučenja polnih hormona i manifestuju se kao preuranjeni pubertet kod oba pola. Prisutan je prevremeni rast pubičnih dlaka (prevremena pubarha), najranije već sa šest meseci, cistične akne, ubrzan somatski rast, kao i ubrzano koštano sazrevanje (New 2006). Kod žena se javljaju hirzutizam i poremećaji menstrualnog ciklusa (oligomenoreja, amenoreja, sindrom policističnih jajnika) (Merke i Bornstein, 2005), dok se kod muškaraca mogu javiti smanjen rast i oligozoospermija (Nimkarn i sar., 2009).

Kriptične forme bolesti kod muškaraca nisu retke, mada su poznati i pacijenti ženskog pola koji ostaju asimptomatični tokom čitavog života (Levine i sar., 1981). Kod njih se dijagnoza najčešće postavlja slučajno kada se vrši skrining članova porodice ili ispitivanja steriliteta (Trapp i Oberfield, 2012). Primarna razlika neklasične od klasične forme bolesti je odsustvo prenatalne virilizacije kod ženskih fetusa, mada se u retkim slučajevima može javiti blaga hipertrofija klitorisa.

Zbog blage kliničke slike, varijabilnog perioda nastupanja simptoma i graničnih hormonskih vrednosti zbog kojih neonatalni skrining ne detektuje uvek neklasičnu formu, smatra se da je ona nedovoljno dijagnostifikovana.

1.2.3.3. JEDNOSTAVNI HETEROZIGOTI

Pacijenti koji su heterozigotni nosioci mutacije u *CYP21A2* genu su obično asimptomatični i ne zahtevaju nikakav tretman. Kod njih, međutim, postoje fine promene u funkcionisanju hipotalamo-hipofizno-adrenalne ose koje se detektuju sinaktenskim testom. Ovim dijagnostičkim hormonskim testom je kod 50-80% nosilaca detektovana blago povišena vrednost 17-OHP (Peter i sar., 1990). Kako vrednosti stimulisano 17-OHP kod njih mogu biti varijabilne, od normalne pa do vrednosti koja se smatra donjom granicom za dijagnozu neklasične forme (Bachega i sar., 2002), genotipiziranje predstavlja superioran metod razlikovanja zdravih individua, jednostavnih heterozigota i pacijenata sa neklasičnom formom KAH-a.

Iako su najčešće bez kliničkih simptoma, povećana učestalost heterozigotnih nosilaca mutiranog *CYP21A2* alela je prisutna kod pacijenata koji pokazuju znakove hiperandrogenizma: prevremenu pubarhu (Ghizzoni i sar, 2011), teške akne (De Raeve i sar., 1995), hirzutizam (Escobar-Morreale i sar., 1999), sindrom policističnih jajnika (Witchel i sar., 2000).

Još uvek nisu u potpunosti rasvetljeni mehanizmi koji održavaju visoku učestalost heterozigota u različitim ispitivanim populacijama. Jedna od hipoteza podrazumeva prisustvo balansne selekcije i povećane adaptivne vrednosti heterozigota koji brže uspostavljaju homeostazu u odgovoru na stres izazvan infekcijom,

inflamacijom i drugim sredinskim faktorima (Witchel i sar., 1997), dok su Nordenström i sar. (2017) pokazali da heterozigotni nosioci imaju i manji rizik za razvoj psihijatrijskih oboljenja.

1.2.4. STEROID 21-HIDROKSILAZA (CYP21A2)

Steroid 21-hidroksilaza (CYP21A2) pripada velikoj porodici citohrom P450 enzima koja broji preko 1300 članova sa važnim fiziološkim ulogama u svim vrstama. Prisustvo prostetičke hem grupe sa atomom gvožđa u centru je zajedničko za sve enzime, a naziv „P450” vodi poreklo od svojstva ove hromofore da apsorbuje svetlost sa maksimumom apsorpcije na 450nm u redukovanom stanju. Funkcionalno su podeljeni na enzime odgovorne za oksidativni metabolizam širokog spektra ksenobiotičkih jedinjenja (lekova, kancerogena) i na one koji su esencijalni za metabolizam endogenih supstrata kao što su steroidni hormoni, prostaglandini, leukotrieni, masne i žučne kiseline (Robins i sar., 2006). Postoji šest CYP proteina (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1 i CYP21A2) koji učestvuju u sintezi steroidnih hormona kod ljudi. Proteini CYP11A1, CYP11B1 i CYP11B2 su locirani u unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, dok su CYP17A1, CYP19A1 i CYP21A2 mikrozomalne monooksigenaze (Zhao i sar., 2012), smeštene u endoplazmatičnom retikulumu, orijentisane prema citosolu.

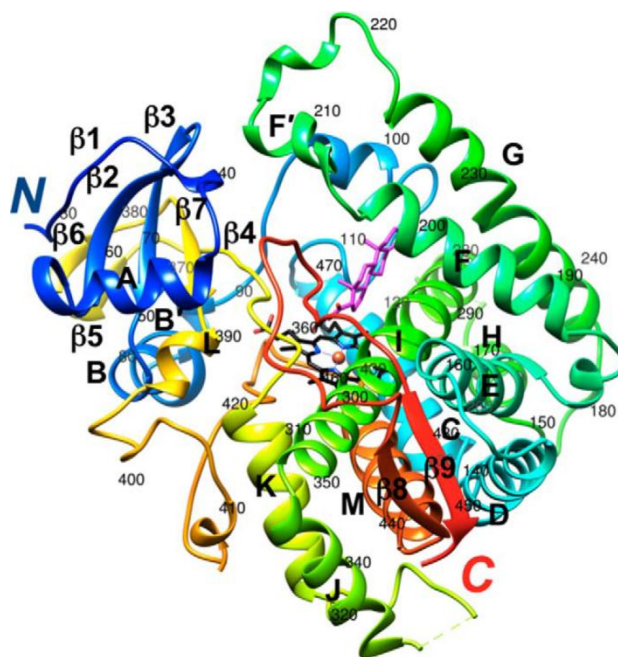
Zbog svoje hidrofobne prirode kristalna struktura humanog CYP21A2 vezanog za supstrat progesteron, izolovana je tek nedavno (^aPallan i sar., 2015). Ona je pokazala da je humani enzim katalitički najaktivniji od svih sisarskih P450 enzima, da se sastoji od 13 α -heliksa i 9 β -ploča i da podseća na trougaonu prizmu (slika 4).

Na osnovu komparativne analize dostupnih strukturnih podataka P450 enzima definisano je više funkcionalnih domena:

1. **Domen za vezivanje za membranu.** CYP21A2, kao i drugi sisarski citohromi, su integralno vezani za membranu N-terminalnim heliksom.
2. **Hem vezujući domen.** Gvožđe hema je kritično za katalitičku funkciju enzima. Posедуje šest koordinativnih veza od kojih preko četiri interaguje sa protoporfirinskim prstenom, jednom je vezan za sulfhidrilnu grupu potpuno

očuvanog cisteina, dok je ligand na preostaloj poziciji voda ili molekul kiseonika.

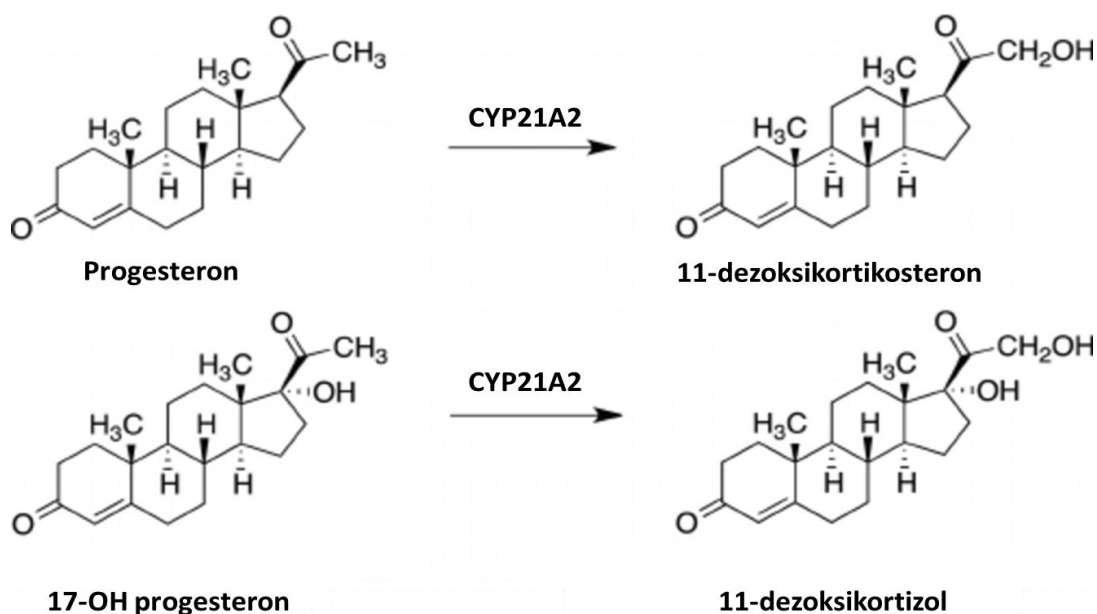
3. **Domen za vezivanje supstrata.** Kao i većina P450 supstrata steroidi su relativno hidrofobni molekuli, te je stoga mesto vezivanja supstrata sastavljeno primarno od hidrofobnih aminokiselinskih rezidua.



Slika 4. Kristalna struktura humanog CYP21A2 proteina u kompleksu sa progesteronom (PDB ID kod 4Y8W) (preuzeto iz ^aPallan i sar., 2015).

Humana steroid 21-hidroksilaza se javlja u dve izoforme identične enzimatske aktivnosti. Jedna izoforma se sastoji od 494 aminokiselina (Higashi i sar., 1986, White i sar., 1986), dok je u drugoj prisutan leucin viška u N-terminalnom hidrofobnom domenu te sadrži 495 aminokiselina (Rodrigues i sar., 1987). Primarno mesto ekspresije CYP21A2 je kora nadbubrežne žlezde, ali su istraživanja pokazala da nizak nivo ekspresije postoji i u ljudskoj koži (Slominski i sar., 1996), srcu (Kayes-Wandover i sar., 2000), hipokampusu (Beyenburg i sar., 2001) i limfocitima (Zhou i sar., 1997). Odgovorna je za katalizu hidrosilacije progesterona do 11-dezoksikortikosterona i 17-

OHP do 11-dezoksikortizola (slika 5), prihvatajući elektrone od NADPH-zavisne citohrom P450 reduktaze (Kominami i sar., 2001) i redukujući pritom molekularni kiseonik. P450 reduktaza je neophodna jer NADP donira elektrone u paru, a P450 enzimi mogu da prihvate samo jedan elektron (Sevrioukova i sar., 1995).



Slika 5. Reakcije katalizovane steroid 21-hidroksilazom (preuzeto i modifikovano iz Zhao i sar., 2012).

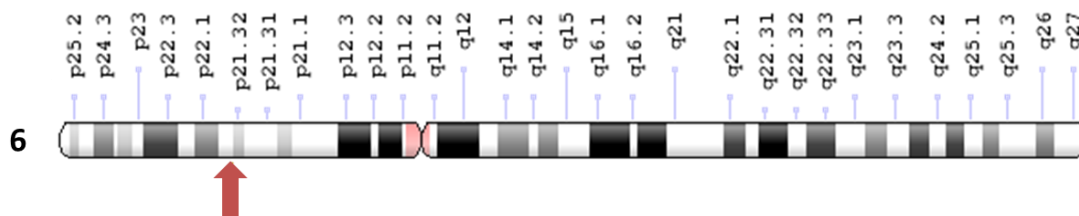
Težina kliničke slike pacijenta obolelog od KAH-a je u korelaciji sa stepenom CYP21A2 enzimske deficijencije. Analiza primarne sekvence svih sisarskih CYP21A2 proteina je pokazala da se više od 85% mutacija prisutnih kod ljudi javlja u malom broju visoko evoluciono očuvanih rezidua važnih za katalitičku funkciju, pri čemu su pozicije mutacija distribuirane od N-terminalnog regiona do C-terminalne petlje u svim strukturnim elementima (Zhao i sar., 2012). Mutacije koje narušavaju vezivanje enzima za membranu, vezujuća mesta za hem i supstrat, kao i stabilnost CYP21A2 enzima, izazivaju kompletan gubitak funkcije i klasičnu formu bolesti sa gubitkom soli. Mutacije koje menjaju transmembranski region ili evoluciono očuvane hidrofobne rezidue redukuju aktivnost enzima do 98% i izazivaju jednostavnu

virilizujuću formu. Blaga neklasična forma bolesti je rezultat interferencije sa oksidoreduktaznim interakcijama, mrežom vodoničnih veza i neočuvanim hidrofobnim klasterima (Haider i sar., 2013). U navedenom slučaju mutacije se najčešće nalaze na periferiji ili blizu površine proteina dozvoljavajući očuvanje parcijalne enzimske aktivnosti (^bPallan i sar., 2015).

1.2.5. CYP21 GENI

1.2.5.1. STRUKTURA CYP21 GENA

Funkcionalni *CYP21A2* gen (starija nomenklatura *CYP21*, *CYP21B*, GenBank NC_000006.12, Gene ID 1589) koji kodira steroid 21-hidroksilazu je mapiran na kratkom kraku hromozoma 6 (6p21.3) u regionu III klase glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC klasa III)(Carroll i sar., 1985; White i sar., 1986; Higashi i sar., 1986) (slika 6).

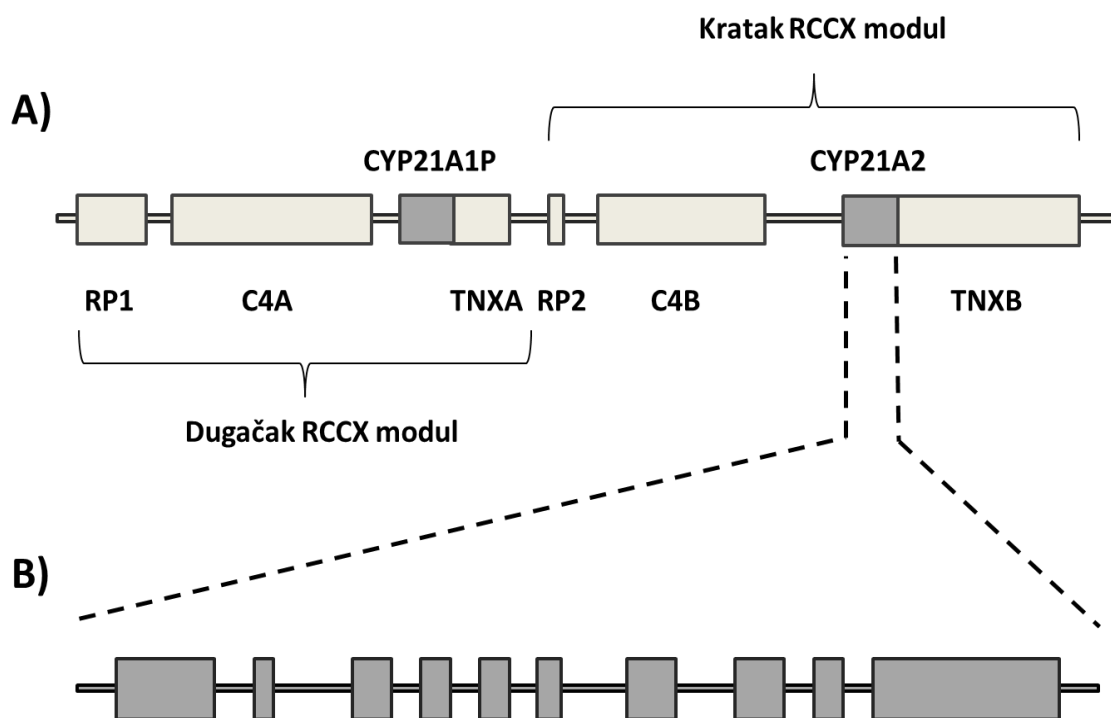


Slika 6. Genomska lokacija *CYP21A2* gena: hromozom 6p21.3.

Na udaljenosti od oko 30 kb uzvodno lociran je nefunkcionalan *CYP21A1P* pseudogen (starija nomenklatura *CYP21A*, *CYP21P*). I aktivan gen i pseudogen se sastoje od 10 egzona, po čemu se razlikuju od ostalih citohroma P450, dužine su 3.4 kb i pokazuju visok procenat homologije u egzonskim (98%) i intronskim (96%) sekvencama (White i sar., 1986; Higashi i sar., 1986). Tokom evolucije pseudogen je, međutim, akumulirao mutacije koje su potpuno inaktivisale njegov genski produkt.

1.2.5.2. GENOMSKA ORGANIZACIJA *CYP21A2* GENSKOG LOKUSA

Aktivan gen i pseudogen su zajedno sa susednim genima za serin/treonin kinazu (RP), protein komplementa seruma (C4) i protein ekstraćelijskog matriksa tenascin (TNX) organizovani u vidu RCCX (*RP-C4-CYP21-TNX*) modula (Goncalves i sar., 2007) (slika 7).



Slika 7. Genomska organizacija *CYP21A2* genskog lokusa (A) Bimodularna organizacija RCCX regiona na hromozomu 6p21.3. (B) Shematska struktura *CYP21A2* gena.

Kod ljudi 70-80% haplotipova hromozoma šest je bimodularno odnosno sadrži dva RCCX modula. Geni u bimodulu su orijentisani od telomere ka centromeri sledećim redosledom: *RP1-C4A-CYP21A1P-TNXA-RP2-C4B-CYP21A2-TNXB*, pri čemu geni *C4A*, *C4B*, *CYP21A2*, *RP1* i *TNXB* kodiraju funkcionalne proteine, dok su njihovi okrnjeni pseudogeni *CYP21A1P*, *TNXA* i *RP2* nefunkcionalni (Yang i sar., 1999). Geni *C4A* i *C4B* kodiraju dve varijante C4 proteina, kiselu C4A i baznu C4B izoformu, koje

se razlikuju u nekoliko aminokiselina, ali zbog prisustva endogene retroviralne sekvence (HERV-K) postoji značajna razlika u njihovoj dužini (Dangel i sar., 1994). Stoga se RCCX bimodul sastoji od dugačkog RCCX modula koji uključuje *RPI*, *C4A* (dugački), *CYP21A1P* i *TNXA*, i kratkog RCCX modula koji sadrži *RP2*, *C4B*, *CYP21A2* i *TNXB*. Dužina celog ovog genskog klastera iznosi oko 120 kb i opšte je prihvaćeno da je do njegove konfiguracije dovela davna duplikacija gena. Pored bimodularnih u mnogim populacijama su prisutni i monomodularni (15%), trimodularni (10%) (Yang i sar., 1999; Blanchong i sar., 2000; Koppens i sar., 2002), pa čak i kvadrimodularni haplotipovi (Chung i sar., 2002) Tandemska organizacija RCCX modula i visok stepen homologije tandemski ponovljenih segmenata čine ovaj region podložnim učestalim rekombinacionim greškama.

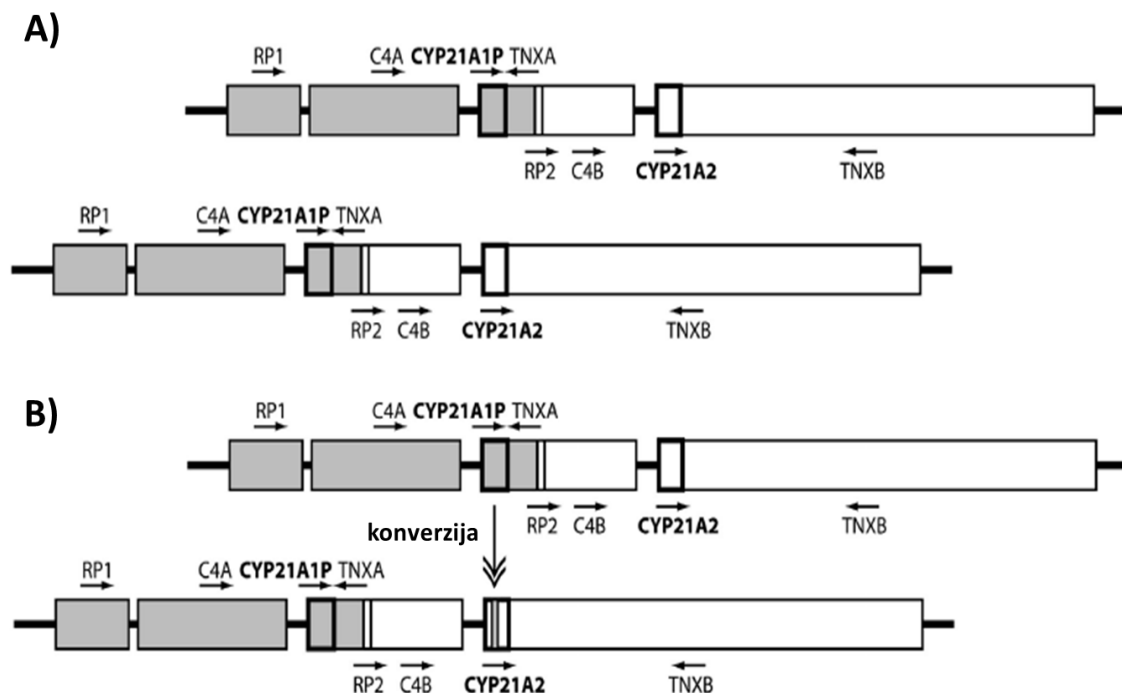
1.2.6. MUTACIJE U *CYP21A2* GENU

Prema HGMD bazi podataka mutacija humanih gena (eng. *The Human Gene Mutation Database*, HGMD, www.hgmd.cf.ac.uk) u *CYP21A2* genu je do danas prijavljeno preko 200 mutacija čineći ga jednim od najvarijabilnijih humanih gena. Većina mutiranih alela nastaje rekombinacijom između aktivnog *CYP21A2* gena i visoko homologog, neaktivnog *CYP21A1P* pseudogena (Day i sar., 1995). Genska konverzija i nejednaka razmena delova homologih sekvenci između nesestrinskih hromatida u mejozi (eng. *crossing over*, CO) predstavljaju dva osnovna mehanizma koja dovode do nastanka greške.

1.2.6.1. MUTACIJE NASTALE PROCESOM GENSKE KONVERZIJE

Kod većine pacijanata deficijencija 21-hidroksilaze je posledica genske konverzije. Približno 75% mutacija su mutacije normalno prisutne u pseudogenu koje se putem procesa genske konverzije kopiraju u aktivan gen (Tusié-Luna i White, 1995). Naime, zbog visokog stepena homologije u sekvencama između tandemski ponovljenih RCCX modula prilikom pogrešnog sparivanja sestrinskih hromatida u mitozu dolazi do kopiranja dela jedne hromatide u drugu (slika 8). Na ovaj način dolazi do zamene dela

CYP21A2 gena homologom, ali defektnom sekvencom *CYP21A1P* pseudogena (Donohoue i sar., 1986; Urabe i sar., 1990; Tusié-Luna i White, 1995).

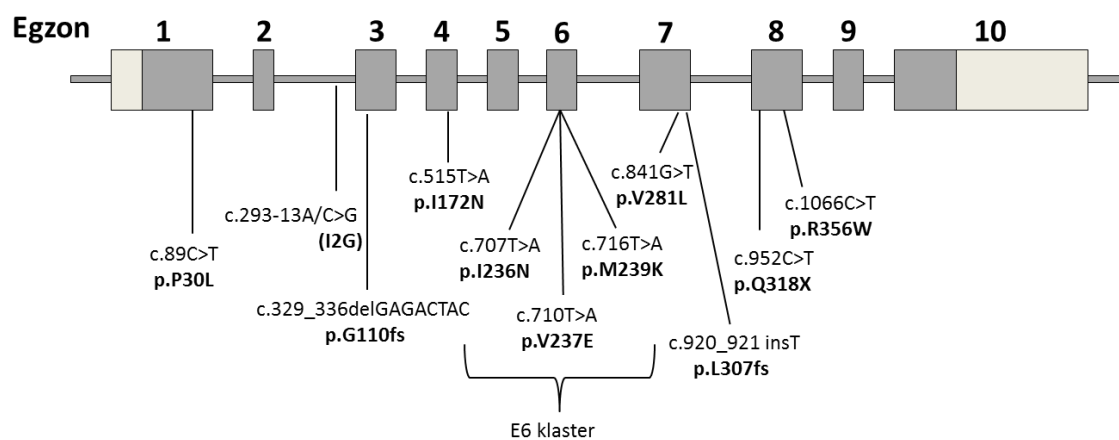


Slika 8. Shematski prikaz procesa genske konverzije kojim dolazi do kopiranja mutacija specifičnih za pseudogen u aktivan *CYP21A2* gen. (A) Zbog tandemske organizacije RCCX modula dolazi do pogrešnog sparivanja sestričkih hromatida tokom mitoze. (B) Tada može doći do kopiranja homologe sekvence sa inaktivirajućim mutacijama iz *CYP21A1P* pseudogena u aktivan *CYP21A2* gen (preuzeto i modifikovano iz Genetic Steroid Disorders, 2014).

Genskom konverzijom može doći do zamene dužih sekvenci koje uključuju više egzona ili kratkih sekvenci od svega 50-200 bp. Ovakve male konverzije ili mikrokonverzije najučestaliji su uzrok deficijencije 21-hidroksilaze i u zavisnosti od tipa mutacije prisutne u okviru kopirane sekvence pseudogena rezultat je parcijalni ili potpuni gubitak aktivnosti steroid 21-hidroksilaze. Reverzna genska konverzija koja

podrazumeva kopiranje sekvence aktivnog gena u *CYP21A1P* pseudogen je takođe moguća, ali zbog velikog broja i distribuiranosti mutacija u svim egzonima pseudogena praktično je nemoguće povratiti njegovu funkciju.

U pseudogenu je prisutno 11 učestalih mutacija od čega mutacija **c.290-13A/C>G** (c.290-13A/C>G) dovodi do pogrešnog iskrajanja drugog introna (eng. *splice mutation*), mutacije **p.G110fs** (c.329_336delGAGACTAC) i **p.L307fs** (c.920_921 insT) dovode do promene okvira čitanja (eng. *frameshift mutations*), mutacija **p.Q318X** (c.952C>T) dovodi do prevremenog formiranja STOP kodona (eng. *nonsense mutation*), dok mutacije **p.P30L** (89C>T), **p.I172N** (c.515T>A), **p.[I236N; V237E; M239K]** c.[707T>A; 710T>A; 716T>A], **p.V281L** (c.841G>T), **p.L307fs** (c.920_921 insT), **p.R356W** (c.1066C>T) dovode do nesinonimnih aminokiselinskih zamena (eng. *missense mutation*)(slika 9).

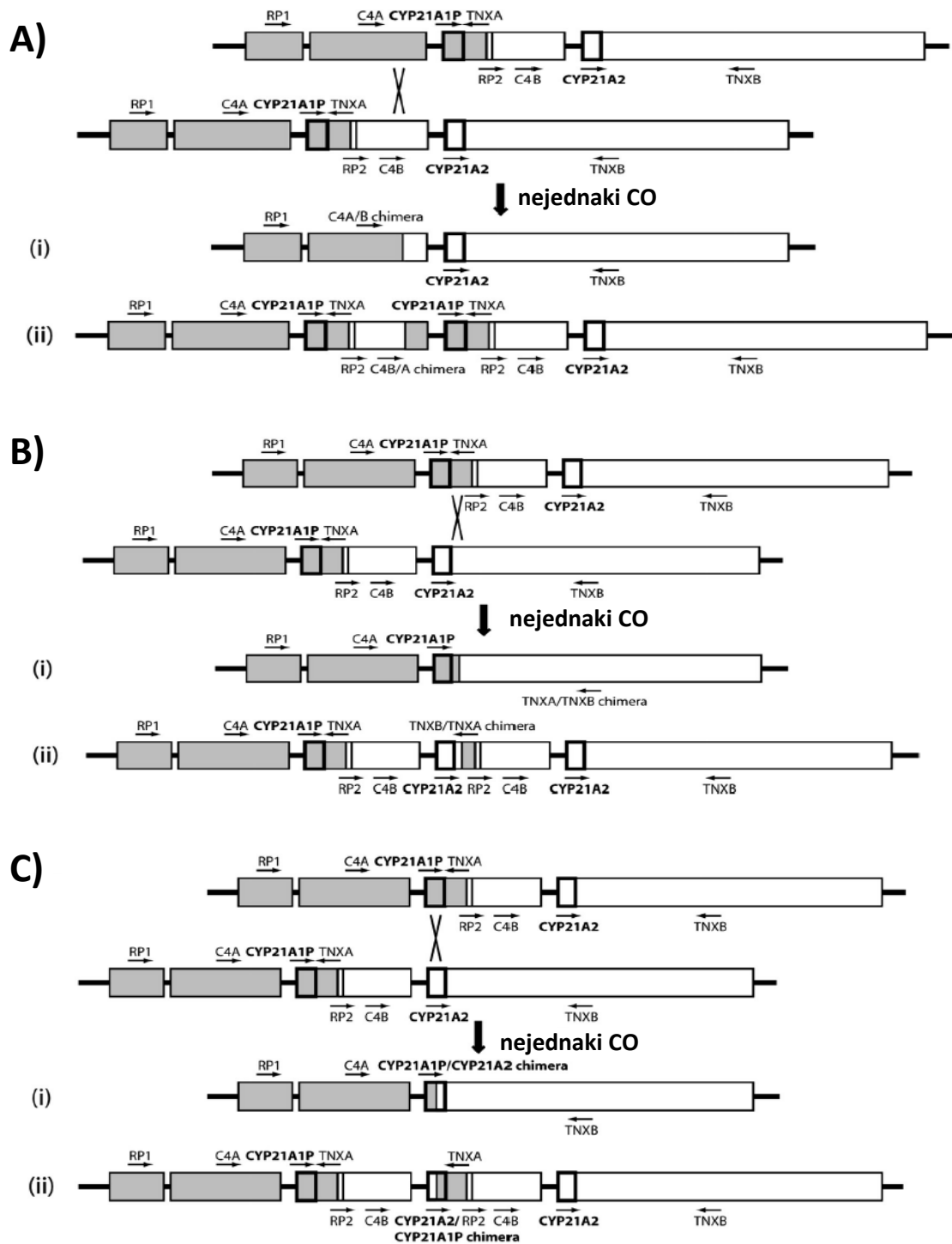


Slika 9. Shematski prikaz *CYP21A2* gena sa učestalim mutacijama specifičnim za pseudogen kopiranim genskom konverzijom. Sve mutacije su označene na osnovu cDNK referentne sekvence i kao što preporučuje HGVS baza podataka (<http://www.hgvs.org/varnomen>). Broj korišćene referentne sekvence za *CYP21A2* je [NM_000500.7](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000500.7) (GenBank). Prikazane su i njihove pozicije u genu, pri čemu su kodirajuće sekvence označene tamno sivim, a netranslatirani regioni svetlo sivim pravougaonicima (preuzeto i modifikovano iz Genetic Steroid Disorders, 2014).

1.2.6.2. MUTACIJE NASTALE NEJEDNAKOM RAZMENOM DELOVA HOMOLOGIH SEKVENCI

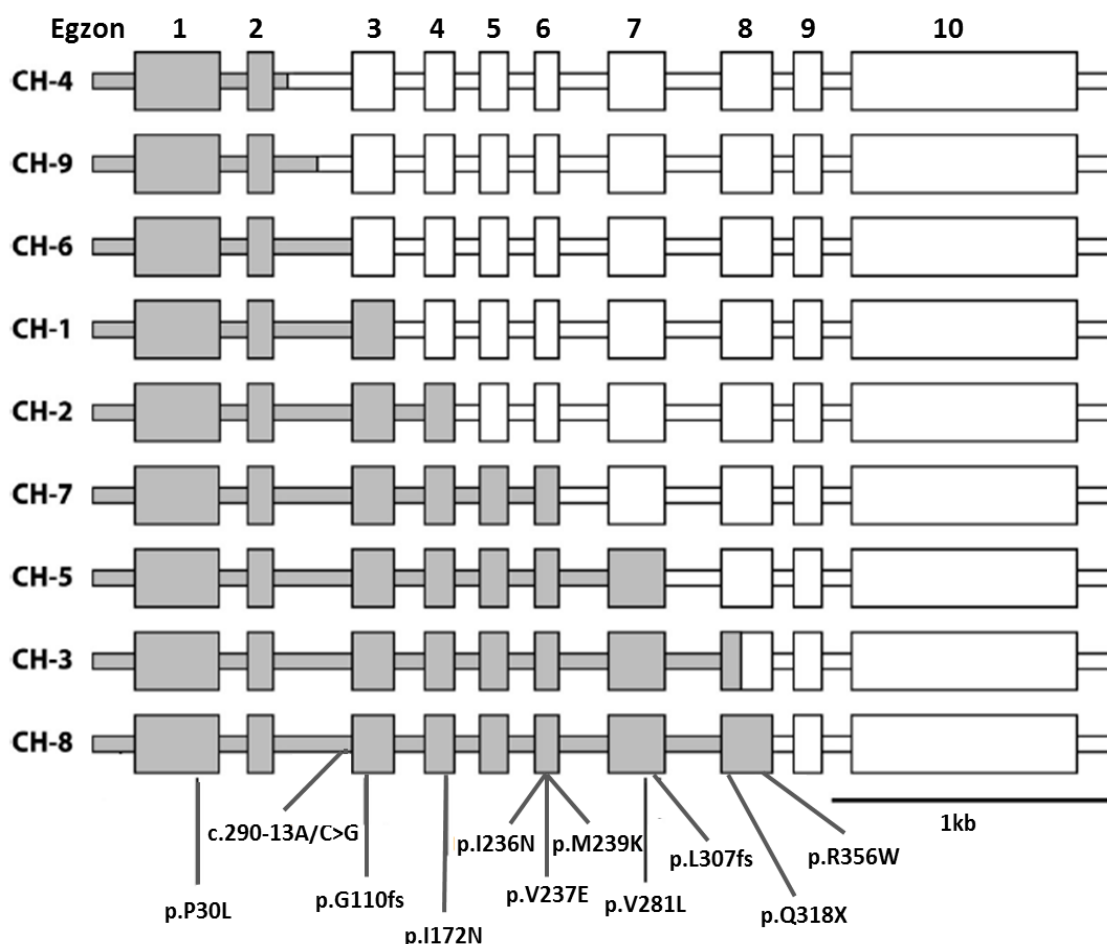
Pogrešno sparivanje homologih hromozoma i nejednaka razmena delova homologih sekvenci između nesestrinskih hromatida u mejozi može rezultovati pojavom velikih delecija i duplikacija koje čine oko 20-25% svih mutacija u *CYP21A2* genu. Velike delecije, uniformne veličine od 30 kb, dovode ili do potpunog gubitka *CYP21A2* gena (New i sar., 2014) ili do formiranja jedinstvenog *CYP21A1P/CYP21A2* fuzionog gena (Chen i sar., 2012). Nejednaki CO može da se desi bilo gde u dupliciranom regionu od 30 kb pri čemu dolazi do prenosa jednog modula sa jednog hromozoma na drugi, a tačke prekida određuju nastale hibride. Rizik za deficijenciju 21-hidroksilaze je zavistan od toga da li se prekid desio u *C4*, *CYP21* ili *TNX* genima (slika 10).

Crossing over sa tačkom prekida u *C4* genima dovodi do formiranja funkcionalnih *C4A/C4B* i *C4B/C4A* himernih gena (slika 10A), pri čemu jedan hromozom nasleđuje aktivan *CYP21A2* gen, dok drugi nasleđuje dve kopije pseudogena i jednu kopiju aktivnog gena. Kako oba hromozoma imaju kopiju aktivnog gena ne postoji rizik za deficijenciju 21-hidroksilaze. Ukoliko su međutim tačke prekida u *TNX* genima na jednom hromozomu će doći do kompletne delecije *CYP21A2* gena i formiranja *TNXA/TNXB* himernog gena, dok će drugi hromozom naslediti *TNXB/TNXA* himerni gen i dupliciran *CYP21A2* gena (slika 10B). Potomstvo koje nasledi hromozom sa delecijom *CYP21A2* je u riziku za deficijenciju 21-hidroksilaze. Kompletna delecija *RP2-C4B-CYP21A2* gena i nastanak *TNXA/TNXB* himernog gena rezultuje recesivnim genetičkim sindromom Ehlers-Danlos koji pored deficijencije 21-hidroksilaze podrazumeva i gubitak funkcije strukturne komponente vezivnih tkiva tensacina-X (Schalkwijk i sar., 2001). Merke i sar. (2013) su zabeležili da ovi pacijenti čine 13% svih KAH pacijenata kod kojih je nejednaki *crossing over* doveo do delecije od 30 kb. U poslednjem slučaju kada su tačke prekida u *CYP21* genima rezultat su hromozom koji ima *CYP21A1P/CYP21A2* himerni gen i nosi rizik za deficijenciju 21-hidroksilaze i hromozom koji nosi i *CYP21A2/CYP21A1P* i funkcionalni *CYP21A2* gen (slika 10C), te ne predstavlja rizik za potomstvo. Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni se sastoje od različitih proporcija aktivnog gena i pseudogena, određenih tačkama prekida, pri čemu 5' kraj odgovara *CYP21A1P* pseudogenu, a 3' *CYP21A2* genu (slika 11). Inaktivirajuće



Slika 10. Prikaz mehanizma nejednakog *crossing over*-a između dva bimodularna hromozoma sa tačkama prekida u *C4* genima (A), *TNX* genima (B) i *CYP21* genima (C) (preuzeto i modifikovano iz Genetic Steroid Disorders, 2014).

mutacije lokalizovane u fragmentu pseudogena onemogućavaju produkciju aktivnog enzima.



Slika 11. Struktura *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena. Sivi i beli regioni predstavljaju sekvence nefunkcionalnog *CYP21A1P* i funkcionalnog *CYP21A2* gena, kako sledi. Proporcija pseudogena je prikazana sa označenim odgovarajućim mutacijama (preuzeto i modifikovano iz Genetic Steroid Disorders, 2014).

Do danas je opisano devet tipova *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena. Izuzev CH-4 i CH-9 svi sadrže i tešku c.290-13A/C>G mutaciju specifičnu za pseudogen te su asocirani sa formom KAH-a sa gubitkom soli i označeni su kao klasični. Kod himernih gena CH-4 i CH-9 tačka prekida je, međutim, locirana između prvog egzona i drugog

introna, uzvodno od c.290-13A/C>G mutacije. Ovakvi himerni geni, označeni kao atenuirani, sadrže slabiji *CYP21A1P* promotor i samo p.P30L mutaciju zbog čega zadržavaju parcijalnu aktivnost 21-hidroksilaze i rezultuju blažim neklasičnim fenotipom (Chen i sar., 2012). Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni su u literaturi često opisivani i kao velike konverzije zbog strukture samog produkta, a ne mehanizma kojim dolazi do njihovog nastanka.

Kompletna delecija *CYP21A2* gena i prisustvo himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena komplikuju analizu mutacija metodologijom baziranom na PCR reakciji i uzrok su poznatog dijagnostičkog artefakta zvanog „allele dropout” (Day i sar., 1995; Day i sar., 1996). Odsustvo specifičnih mesta za vezivanje prajmera dizajniranih za amplifikaciju celog *CYP21A2* gena onemogućava amplifikaciju alela kod koga je došlo do delecije te rezultujuća sekvenca odgovara isključivo drugom, na taj način neizmenjenom alelu. U takvim slučajevima prividna homozigotnost zapravo je posledica nejednake amplifikacije alela (Day i sar., 1996). Ova pojava mora biti uzeta u obzir prilikom analize rezultata i kod svakog neslaganja kliničkih, biohemijskih i genetičkih podataka. Za njeno razjašnjenje i u cilju izbegavanja potencijalno pogrešne interpretacije rezultata, kod svakog pacijenta obolelog od KAH-a indikovana je rutinska analiza himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena, kao i genotipa oba roditelja (Krone i sar., 2002).

1.2.6.3. RETKE I *DE NOVO* MUTACIJE

Retke mutacije koje nisu očigledan rezultat genske konverzije su tokom poslednjih nekoliko decenija intenzivno prijavljivane i pobrojane u odgovarajućim bazama podataka (www.hgmd.cf.ac.uk, www.cypalleles.ki.se (Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Comitee)). U većini populacija čine oko 5% mutiranih alela (White i sar., 2000). Najčešće su prijavljivane u pojedinačnim porodicama ili malim populacijama (Krone i Arlt., 2009), mada ima i onih koje su šire rasprostranjene (npr. p.P453S).

Oko 1% inaktivirajućih *CYP21A2* mutacija nastaje *de novo* (White i sar., 2000). U takvim retkim slučajevima proband nosi mutaciju koja očigledno nije nasleđena od roditelja. Dokumentovane su i *de novo* delecije i *de novo* genske konverzije (Concolino

i sar., 2010), pri čemu podaci iz literature ukazuju da se delecije dešavaju isključivo u mejozi, dok se genske konverzije javljaju i tokom mitoze i tokom mejoze. Najčešća *de novo* mutacija sa procenjenom učestalošću od 1 u 2×10^4 u opštoj populaciji (Tusié-Luna i sar., 1995) je mikrokonverzija u intronu 2 koja uvodi c.290-13A/C>G u aktivan gen. *De novo* mutacije mogu biti uzrokovane mejotičkom mutacijom u gametogenezi roditelja, somatskom mutacijom u germinativnoj liniji jednog od roditelja ili retko uniparentalnom izodizomijom. U poslednjem slučaju potomstvo nasleđuje dve identične kopije mutiranog hromozoma od jednog roditelja koji je nosilac mutacije (Lopez-Gutierrez i sar., 1998). Test očinstva ponekad može objasniti zašto potomak nosi mutaciju koja nije prisutna kod roditelja (New i sar., 2014).

1.2.6.4. FENOTIPSKI NEUTRALNE VARIJANTE U *CYP21A2* GENU

Visoka stopa varijanti neutralnih u odnosu na fenotip bolesti je prisutna i u *CYP21A2* genu i u *CYP21A1P* pseudogenu. Dodatni leucin blizu N-terminusa i p.D183E se javljaju i u pseudogenu, putem procesa genske konverzije se kopiraju u aktivan gen, ali nemaju uticaj na aktivnost enzima (Higashi i sar., 1991). Sa druge strane, varijante p.K102R, p.S268T i p.N493S (Rodrigues i sar., 1987; Wu i Chung, 1991) ne nastaju procesom genske konverzije. Iako su navedene uobičajene varijante okarakterisane kao normalne, ne može biti isključen njihov sinergistički efekat ukoliko su prisutne u istom haplotipu (Asanuma i sar., 1999). Posebno su brojne varijante u drugom intronu čiji značaj nije pouzdano objašnjen.

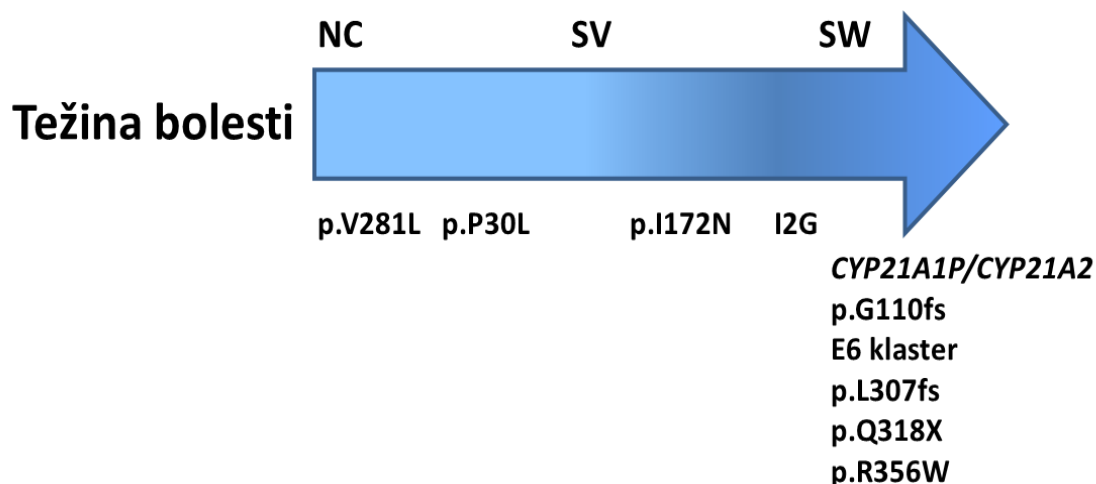
1.2.7. GENOTIP-FENOTIP KORELACIJA

Klasifikacija KAH-a na formu sa gubitkom soli, jednostavnu virilizujuću i neklasičnu formu, koristan je način da se aproksimativno proceni težina bolesti i predvidi neophodna terapija. Najjednostavniji princip uspostavljanja genotip-fenotip korelacije je određivanje koja mutacija se tipično javlja u svakoj od formi bolesti. Pomenuti princip je veoma informativan kada razmatramo učestale mutacije kod homozigotnih nosilaca, međutim većina pacijenata sa deficijencijom 21-hidroksilaze su

složeni heterozigoti (65-75%) kod kojih ovakav pristup ima malu prediktivnu vrednost. Za njih važi pravilo da je klinički fenotip u korelaciji sa alelom sa manjim defektom, odnosno alelom koji dozvoljava veću rezidualnu aktivnost enzima (Speiser i sar., 1992; Krone i sar., 2000).

Na osnovu rezidualne aktivnosti enzima predviđene *in vitro* studijama, *CYP21A2* mutacije su grupisane u odgovarajuće mutacione grupe (Speiser i sar., 1992; Wedell i sar., 1994; Krone i sar., 2000). Velike genske delecije i tačkaste mutacije koje rezultuju nemerljivom aktivnošću enzima su u korelaciji sa formom sa gubitkom soli i svrstane su u „null” mutacionu grupu. *Splice* mutacija c.290-13A/C>G rezultuje minimalnom enzimatskom aktivnošću i pripada „A” grupi. Mutacije koje rezultuju rezidualnom aktivnošću enzima do 5% (p.I172N) i dozvoljavaju biosintezu aldosterona u dovoljnoj meri da gubitak soli bude sprečen, dovode do jednostavne virilizujuće forme i pripadaju „B” mutacionoj grupi. I na kraju, mutacije koje održavaju parcijalnu aktivnost enzima i do 60% (p.P30L) uzrokuju blagu neklasičnu formu i klasifikovane su u treću, „C” mutacionu grupu. Prisustvo bilo koje blage mutacije iz „C” mutacione grupe će odrediti kliničku ekspresiju bolesti bez obzira koja mutacija je prisutna na drugom homologom hromozomu.

Iako je stepen korelacije fenotipa KAH-a i genotipa *CYP21A2* gena uopšteno visok, prijavljeno je i odstupanje od očekivanog fenotipa (Wilson i sar., 1995; New i sar., 2013; Marino i sar., 2011; Krone i sar., 2000). Nekoliko studija je sugerisalo da je stepen konkordantnosti između genotipa i fenotipa kod pacijenata sa najtežom i najblažom formom bolesti visok, dok je kod pacijenata sa umereno teškom formom niži (Krone i sar., 2000; New i sar., 2013) (slika 12). Tako mutacije p.P30L, c.290-13A/C>G i p.I172N pokazuju varijabilne fenotipove. Mutacija p.P30L primarno određuje neklasičnu formu, ali nije redak slučaj da pacijenti sa ovom mutacijom razviju i klasičan oblik bolesti. Sa druge strane, mutacija c.290-13A/C>G koja dovodi do aberantnog iskrajanja drugog introna i asocirana je prevashodno sa formom sa gubitkom soli može uzrokovati i blaži fenotip. Takođe, marginalna enzimatska aktivnost (2%) u slučaju p.I172N mutacije, specifično asocirane sa jednostavnom virilizujućom formom, očigledno nije uvek dovoljna da spreči gubitak soli, te se nekad razvije i najteža forma bolesti.



Slika 12. Korelacija genotip-fenotip kod KAH-a uzrokovanog deficijencijom 21-hidroksilaze. Postoji visoka genotip-fenotip konkordantnost izuzev kod mutacija p.P30L, c.290-13A/C>G i p.I172N koje pokazuju korelaciju sa različitim formama bolesti (preuzeto i modifikovano iz New i sar., 2013).

Brojni drugi genetički i sredinski faktori mogu uticati na fenotip i moraju biti uzeti u obzir kada razmatramo varijabilnost kliničke ekspresije. Postojanje fenotipske varijacije kod članova iste porodice sa istim genotipom (Schulze i sar., 1995; Chin i sar., 1998; Bormann i sar., 1992; Chemaitilly i sar., 2005), kao i poboljšanje kliničke slike tokom vremena kod pacijenata sa teškom formom i potpunim odsustvom enzimatske aktivnosti (Stoner i sar., 1986; Speiser i sar., 1991) govore u prilog tome. Na fenotip mogu uticati mutacije u regulatornim elementima (Araujo i sar., 2007), zatim geni modifikatori koji regulišu steroidnu aktivnost, ekstraadrenalna hidroksilazna aktivnost, kao i različit broj receptora i različita osetljivost na polne hormone, kortizol i aldosteron (Krone i sar., 2000). Takođe, na fenotipsku varijabilnost efekata polnih hormona može delimično uticati i dužina CAG ponovaka gena za androgeni receptor, menjajući tako aktivnost samih polnih hormona (Rocha i sar., 2008).

1.3. OBLICI KAH-A INDUKOVANI DRUGIM STEROIDOGENIM ENZIMIMA

Pored deficijencije 21-hidroksilaze opisane su još četiri forme KAH-a indukovane deficijencijom enzima citohrom P450 familije uključenih u proces steroidogeneze u kori nadbubrežne žlezde (slika 2). Tu spadaju deficijencija steroid 11 β -hidroksilaze, 17 α -hidroksilaze, 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaze tipa 2 i P450 oksidoreduktaze, čije su karakteristike prikazane u tabeli 1. Zajedničko za sve je da se nasleđuju autozomno recesivno, a svaki defekt ponaosob karakteriše jedinstveni biohemijski profil i odgovarajuća klinička slika (Miller i Auchus, 2011). Enzimi 21-hidroksilaza i 11 β -hidroksilaza su eksprimirani isključivo u nadbubrežnoj žlezdi, dok su enzimi 17 α -hidroksilaza, 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2 i P450 oksidoreduktaza eksprimirani i u gonadama.

Tabela 1. Retke forme kongenitalna adrenalne hiperplazije.

Defektni enzim	Gen	Hromozomska lokacija	Učestalost	Klinička slika
11 β -hidroksilaza	<i>CYP11B1</i>	8q24.3	1:200000	Hipertenzija, hipokalemija, hiperandrogenizam, virilizacija
17 α -hidroksilaza	<i>CYP17A1</i>	10q24.3	1:50000	Hipertenzija, hipokalemija, hipogonadizam, odsustvo sekundarnih polnih karakteristika kod ženskog, nedovoljna virilizacija kod muškog pola
3 β -hidroksisteroid dehidrogenaza tipa 2	<i>HSD3B2</i>	1p12	retka	Hiponatremija, hiperkalemija, blaga klitoromegalija kod ženskog, nedovoljna virilizacija kod muškog pola
P450 oksidoreduktaza	<i>POR</i>	7q11.2	retka	Skeletne malformacije, virilizacija kod ženskog, nedovoljna virilizacija kod muškog pola

1.4. KONGENITALNA ADRENALNA HIPERPLAZIJA U SRBIJI

Rana dijagnoza KAH-a merenjem prekursora 17-OH progesterona osušenog uzorka krvi na filter papiru je primenjivana širom sveta. Ovakva strategija ima za cilj da poveća stopu preživljavanja obolelih od teške, potencijalno fatalne, klasične forme bolesti sa gubitkom soli. U Srbiji ovakav neonatalni skrining program još uvek nije uveden. Dijagnoza bolesti se postavlja isključivo na osnovu kliničkih simptoma i hormonskog statusa pacijenata. Merenjem steroidnih hormona u serumu (17-OHP, androstendiona, dehidroepiandrosterona, kortizola, testosterona) određuje se klinička varijanta bolesti, a za razlikovanje zdravih individua, heterozigotnih nosilaca i obolelih od blage neklasične forme se koristi sinaktenski test.

Molekularno-genetička dijagnoza omogućava određivanje genotipa i u svetu se koristi kao komplementarna metoda za potvrdu kliničke i biohemijske dijagnoze. Ovaj vredan dijagnostički alat, u Srbiji nedostupan do 2014. godine, je posebno značajan za potvrdu bolesti u slučajevima kada je 17-OHP neznatno povišen, kao i za preciznu dijagnozu nosilaca i asimptomatskih pacijenata sa blagom neklasičnom formom koji tek kasnije u životu razviju simptome. Prenatalna molekularno-genetička dijagnoza omogućava i genotipizaciju *CYP21A2* gena iz izolovane DNK fetusa. Time je u slučaju dijagnoze KAH-a omogućena primena prenatalnog tretmana kod obolelih ženskih fetusa radi redukovanja genitalne virilizacije i posledičnih problema. Sve ove činjenice ukazuju na izrazitu potrebu za razvojem molekularne dijagnostike u cilju pre- i postanatalne dijagnoze i genetičkog savetovanja pacijenata obolelih od kongenitalne adrenalne hiperplazije u Srbiji.

2. CILJ RADA

Kongenitalna adrenalna hiperplazija (KAH) uzrokovana deficijencijom steroid 21-hidroksilaze je jedan od najučestalijih naslednih endokrinoloških poremećaja sa izuzetno komplikovanom genetičkom osnovom. Molekularno-genetička dijagnostika koja omogućava identifikaciju genotipa i koristi se za finalnu potvrdu kliničke i biohemijske dijagnoze nije dostupna u Srbiji. Stoga su ciljevi ove doktorske disertacije:

- Optimizacija metodologije za detekciju varijanti u kodirajućim i nekodirajućim regionima *CYP21A2* gena.
- Optimizacija metodologije za detekciju *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena nastalih nejednakom razmenom delova homologih sekvenci između aktivnog *CYP21A2* gena i *CYP21A1P* pseudogena.
- Karakterizacija novootkrivenih mutacija primenom kompjuterskih softvera namenjenih predikciji efekta genetičke varijante na strukturu i funkciju proteina.
- Utvrđivanje spektra i učestalosti detektovanih mutacija u populaciji iz Srbije i poređenje sa podacima o učestalostima mutacija u populacijama iz drugih evropskih zemalja, pre svega onih sa kojima je stanovništvo Srbije povezano protokom gena.
- Analiza efekta mutacija u *CYP21A2* genu na osnovu korelacije genotipa i fenotipa analiziranih pacijenata.
- Razvoj optimalnog molekularno-genetičkog algoritma za dijagnozu KAH-a uzrokovnog deficijencijom steroid 21-hidroksilaze na osnovu celokupnog spektra i učestalosti detektovanih mutacija u *CYP21A2* genu kod pacijenata iz Srbije.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. PACIJENTI

U studiju analize molekularno-genetičke osnove KAH-a uključena su 61 nesrodna pacijenta lečena na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”, Institutu za endokrinologiju Kliničkog centra Srbije i Univerzitetskoj dečijoj klinici Tiršova u Beogradu. Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu kliničke slike i hormonskog profila. Uzimajući u obzir bazalne i stimulisane vrednosti 17-OH progesterona u krvi pacijenti su klasifikovani u dve fenotipske forme: teška klasična forma (sa gubitkom soli i jednostavna virilizujuća forma) i blaga neklasična forma. U grupi pacijenata sa KAH-om sa gubitkom soli analizirano je devet muških i jedan ženski pacijent, u grupi pacijenata sa jednostavnom virilizujućom formom KAH-a jedan muški i 14 ženskih, dok je među pacijentima sa neklasičnom formom analizirano 25 ženskih i dva muška pacijenta. U cilju određivanja ili potvrđivanja genotipa pacijenata analizirani su i uzorci srodnika prvog stepena (roditelja, braće/sestara) kad god je to bilo moguće. Krv je uzimana sa 3,8% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 9:1 i transportovana do Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo gde je vršena izolacija DNK.

Ova studija je odobrena od strane Etičkog Komiteta Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić”.

3.1.2. PRAJMERI

Za različite PCR reakcije i reakciju sekvenciranja su korišćeni odgovarajući specifični prajmeri čiji su nazivi i sekvence označeni u tabelama 2, 3 i 4.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni za PCR amplifikaciju aktivnog *CYP21A2* gena (Krone i sar., 2002).

Oznaka prajmera	Pozicija	Sekvenca 5'-3'
CYP21F	5' UTR	CGGGTCGGTGGGAGGGTA
CYP21R	3' UTR	GCGATCTCGCAGCACTGTGT

Tabela 3. Oligonukleotidni prajmeri korišćeni za direktno sekvenciranje *CYP21A2* gena.

Oznaka prajmera	Pozicija	Sekvenca 5'-3'
CYP21-F	5' UTR	CGGGTCGGTGGGAGGGTA
E3-F	Intron 2	GCATATCTGGTGGGGAGAAA
E3-R	Intron 3	CGCTGTGGAGAAACAGTGTG
E45-F	Intron 3	GCCTGCTGAACTCACACTGTT
E45-R	Egzon 6	ACCTGGATTGGGGAAGAACT
E67-F	Egzon 5	TGTGGACGTGATTCCCTTTC
E67-R	Intron 7	AGTGCTCAGAGCTGAGTGAGG
E8910-F	Intron 7	CCTCACTCAGCTCTGAGCACT
CYP21-R	3' UTR	GCGATCTCGCAGCACTGTGT

Tabela 4. Oligonukleotidni prajmeri korišćeni za detekciju *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena nastalih nejednakim *crossing over*-om (Dolžan i sar., 2003).

Velika delecija		Oznaka Prajmera	Pozicija	Sekvenca 5'-3'
Himerni gen sa tačkom prekida do trećeg egzona (CH-Ex3)	Himerni gen -3	-302P-F	Promotorski region <i>CYP21A1P</i>	GCGGACACCCTTGCCTGCACG
		P2-R	Egzon 3 <i>CYP21A2</i>	AGCAGGGAGTAGTCTCCCAAG
	Normalan gen	-302N-F	Promotorski region <i>CYP21A2</i>	GCGGACACTATTGCCTGCACA
		P2-R	Egzon 3 <i>CYP21A2</i>	AGCAGGGAGTAGTCTCCCAAG
Himerni gen sa tačkom prekida od trećeg do šestog egzona (CH-Ex6)	Himerni gen 3-6	-302P-F	Promotorski region <i>CYP21A1P</i>	GCGGACACCCTTGCCTGCACG
		6NA-R	Egzon 6 <i>CYP21A2</i>	AGCTGCATCTCCACGATGTGA
	Normalan gen	-302N-F	Promotorski region <i>CYP21A2</i>	GCGGACACTATTGCCTGCACA
		6NA-R	Egzon 6 <i>CYP21A2</i>	AGCTGCATCTCCACGATGTGA
Himerni gen sa tačkom prekida od šestog do osmog egzona (CH-Ex10)	Himerni gen 6-10	EX6P-F	Egzon 6 <i>CYP21A1P</i>	GCCATAGAGAAGAGGGACCACAA
		EX10N-R	3'UTR	TTAAGCCTCAATCCTCTGCAGCG
	Normalan gen	EX6N-F	Egzon 6 <i>CYP21A2</i>	GCCATAGAGAAGAGGGATCACAT
		EX10N-R	3'UTR	TTAAGCCTCAATCCTCTGCAGCG

3.2. METODE

3.2.1. IZOLACIJA DNK

Za izolaciju DNK iz limfocita periferne krvi korišćen je QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany), prema uputstvu proizvođača.

U mikrotube od 1,5 ml dodavano je 20 μ l *QIAGEN* proteaze, 200 μ l periferne krvi i 200 μ l pufera AL. Smeša je vorteksovana 15 sekundi i zatim inkubirana na 56°C 10 min. Nakon toga je dodavano 200 μ l 100%-nog etanola i smeša je ponovo vorteksovana 15 sekundi. Smeša je zatim nanešena na QIAamp kolonu i izvršeno je centrifugiranje na 8000 rpm u trajanju od jednog minuta. Eluat je odbačen jer se DNK afinitetno vezala za kolonu, a kolona je prebačena u novu tubu. Zatim je dodato 500 μ l pufera AW1 i izvršeno centrifugiranje na 8000 rpm u trajanju od jednog minuta. U ovom koraku se DNK, koja se vezala za kolonu, ispira od nečistoća. Eluat je ponovo odbačen, a kolona prebačena u novu mikrotubu. U sledećem koraku dodat je AW2 pufer koji dodatno oslobađa DNK od nečistoća i izvršeno centrifugiranje na 14000 rpm u trajanju od tri minuta. Eluat je odbačen, kolona prebačena u novu mikrotubu i ponovljeno centrifugiranje na istoj brzini u trajanju od jednog minuta kako bi i poslednji tragovi etanola bili uklonjeni. Kolona je zatim prebačena u čistu mikrotubu od 1,5ml i dodato je 200 μ l pufera AE koji je eluirao DNK sa kolone. Kolona je inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od jednog minuta kako bi se povećao prinos DNK. Centrifugiranjem na 8000 rpm u toku jednog minuta dobijeno je 200 μ l eluata u kome je rastvorena DNK. Nakon izolacije merena je koncentracija dobijene DNK na spektrofotometru *NanoVue (GEHealthcare, Life sciences)*, prema uputstvu za rad na aparatu.

3.2.2. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE

Obzirom na veličinu aktivnog *CYP21A2* gena, za njegovu specifičnu amplifikaciju korišćen je KAPA LongRange PCR system (KAPA Biosystems) koji omogućava umnožavanje regiona do 15 kb. Prajmeri CYP21F i CYP21R su dizajnirani

na osnovu ograničene heterogenosti u nekodirajućim sekvencama kako bi se obezbedila amplifikacija isključivo aktivnog gena, ali ne i pseudogena.

PCR reakciona smeša, finalne zapremine 30 μ l, sadržala je:

- 1X KAPA LR pufer (bez Mg²⁺)
- 1.75 mM MgCl₂
- 0.3 mM svakog dNTP
- 1U DNK polimeraze (Kapa LongRange)
- 15 pmol svakog prajmera
- 130 ng genomske DNK.

Prajmeri su dizajnirani na osnovu ograničene heterogenosti u nekodirajućim sekvencama kako bi se obezbedila amplifikacija isključivo aktivnog gena, ali ne i pseudogena.

Vremenski i temperaturni profil PCR reakcije:

Inicijalna denaturacija 94⁰C/ 4 min

(94⁰C/ 1 min, 65⁰C/ 1 min, 68⁰C/ 6 min) X 14ciklusa

(94⁰C/ 1 min, 65⁰C/ 1 min, 68⁰C/ 6 min+2s elongacije za svaki ciklus) X 18 ciklusa

94⁰C/ 1 min

53⁰C/ 1 min

72⁰C/ 15 min

3.2.3. ANALIZA DNK NA AGAROZNOM GELU

Za verifikaciju uspešnosti lančane reakcije umnožavanja *CYP21A2* gena korišćena je horizontalna elektroforeza na 1%-nom agaroznom gelu (Maniatis i sar., 1982).

Kao pufer za pripremanje gela korišćen je 1X koncentrovan TAE pufer (0,04M Tris-acetat; 0,002M EDTA pH8,0). Isti pufer je korišćen i za elektroferazu. U gel je

dodat etidijum bromid u finalnoj koncentraciji 0,5µg/ml. Etidijum bromid je fluorescentna boja koja se interkalira u DNK i predstavlja najpogodnije sredstvo za vizuelizaciju DNK na agaroznom gelu. Elektroforeza je tekla pri jačini struje od 100 mA i konstantnom naponu od 100 V. Nakon završene elektroforeze gel je analiziran pod UV svetlom talasne dužine 312 nm. Za određivanje veličine fragmenata DNK korišćen je komercijalni DNK marker od 1kb (*Fermentas*).

3.2.4. PREČIŠĆAVANJE PCR PRODUKTA NA KOLONI

Za prečišćavanje PCR produkata na koloni je korišćen komplet *QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)*, prema uputstvu proizvođača. U mikrotubu sa PCR smešom je dodavano 85 µl PB pufera smeše, nakon čega je smeša vorteksovana i centrifugirana tokom 5 s. Čitava zapremina je nanošena na QIAquick spin kolonu i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min radi vezivanja umnoženog PCR produkta za kolonu. Eluat je odbacivan, nakon čega je kolona ispirana sa 750 µl pufera PE, a zatim i centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min. Nakon odbacivanja eluata kolona je dodatno centrifugirana na 13 000 rpm tokom 1 min, zbog dodatnog uklanjanja preostale tečnosti. QIAquick kolona je na kraju prebacivana u čistu mikrotubu od 1,5 ml i vršeno je eluiranje sa kolone uz pomoć EB pufera centrifugiranjem na 13 000 rpm tokom 1 min. Na ovaj način se produkti PCR reakcije oslobađaju od preostalih prajmera, neugrađenih nukleotida, polimeraze i soli.

3.2.5 AUTOMATSKO SEKVENCIRANJE DNK

Poznavanje sekvence DNK je nezamenljiva osnova bioloških istraživanja. Metoda sekvenciranja koju su razvili Sanger i saradnici 1977. godine predstavlja moćnu tehniku molekularne biologije koja je omogućila analizu gena na nukleotidnom nivou određivanjem redosleda četiri baza (A, T, G i C) u DNK lancu.

Za sekvenciranje DNK korišćen je *BigDyeTM Terminators Version 3.1 Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*, prema uputstvu proizvođača. Produkti reakcije

sekvenciranja su analizirani kapilarnom elektroforezom na automatskom sekvenceru (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*).

Nakon amplifikacije kompletne sekvence aktivnog *CYP21A2* gena long-range PCR reakcijom, provere uspešnosti PCR reakcije na agaroznom gelu i prečišćavanja amplifikovanih produkata na koloni, DNK matrica je pripremljena i pristupa se reakciji sekvenciranja za koju su u izradi ovog rada korišćeni prajmeri označeni u tabeli 3. Kombinacija navedenih prajmera omogućila je sekvenciranje kompletne egzonske i intronske sekvence *CYP21A2* gena.

Reakciona smeša za sekvenciranje, finalne zapremine 5 μ l, sadržala je:

- prečišćen PCR produkt (60ng za dužinu od 3,4kb)
- 2 pmol prajmera
- 0,5 μ l Ready reaction mix (*Applied Biosystems*)

Temperaturni i vremenski profil PCR reakcije za sekvenciranje:

96°C/1min

(96°C/10s, 50°C/5s, 60°C/4min) X 25 ciklusa

4°C/ ∞

Nakon reakcije sekvenciranja vršeno je prečišćavanje uzoraka precipitacijom natrijum-acetatom. Dodato je 40 μ l 0,1M natrijum-acetata pH 5,2 rastvorenog u etanolu, izvršeno je centrifugiranje 20 min na 13000 rpm nakon čega je uklonjen supernatant. Talogu je zatim dodato 200 μ l 70% etanola, praćeno centrifugiranjem 10 min na 13000 rpm, uz ponovno uklanjanje supernatanta. Ovaj korak je ponavljan dva puta. Nakon drugog ispiranja etanolom talog je u potpunosti osušen, pa potom rastvoren u 25 μ l formamida (*HiDi Formamide, Applied Biosystems*) i celokupna zapremina je upotrebljena za kapilarnu elektroforezu.

Digitalni zapis dobijen tokom kapilarne elektroforeze je obrađen *Sequencing Analysis Software v5.3.2 with KB Basecaller v1.4 (Applied Biosystems)*. U cilju

identifikacije varijacija dobijene sekvence vršeno je upoređivanje sa referentnom *CYP21A2* sekvencom (NCBI Gen Bank Reference Sequence: NM_000500.7).

3.2.6. DETEKCIJA HIMERNIH *CYP21A1P/CYP21A2* GENA PCR-SPECIFIČNOM REAKCIJOM (PCR-SSP)

Velike delecije koje nastaju nejednakom razmenom delova homologih sekvenci i rezultuju stvaranjem različitih *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena su analizirane primenom tri PCR reakcije sa prajmerima specifičnim za sekvencu (PCR-SSP) (tabela 4). Parovi prajmera su dizajnirani tako da „forward” prajmer odgovara sekvenci pseudogena koja čini 5’ deo himernog gena, dok je „reverse” prajmer specifičan za aktivan gen koji čini 3’ deo himernog gena. Tri seta prajmera su omogućila detekciju tri arbitrarno određene klase himernih gena: himerne gene sa tačkom prekida između pozicije -302 i egzona 3 (CH-Ex3), koji odgovaraju CH-4, CH-9 i CH-6, himerne gene sa tačkom prekida između trećeg i šestog egzona (CH-Ex6), koji odgovaraju CH-1 i CH-2, i himerne gene sa tačkom prekida između šestog i desetog egzona (CH-Ex10) koji odgovaraju CH-7, CH-5, CH-3 i CH-8 (tabela 4, slika 11)(Dolžan i sar., 2003).

Par prajmera od kojih je „forward” prajmer specifičan za promotor pseudogena (-302P), a „reverse” prajmer specifičan za sekvencu u trećem egzonu aktivnog gena (P2) je omogućio amplifikaciju produkta dužine 1704bp i detekciju himernih gena sa tačkom prekida od -302 do trećeg egzona. Par prajmera od kojih „forward” prajmer odgovara promotoru pseudogena (-302P), a „reverse” prajmer sekvenci šestog egzona (6NA) aktivnog gena omogućava amplifikaciju produkta dužine 1030 bp i detekciju himernih gena sa tačkom prekida do šestog egzona. Za svaki uzorak paralelno se vrši detekcija himernih gene sa tačkom prekida do trećeg i do šestog egzona. Ukoliko PCR-SSP reakcija za himerni gen sa tačkom prekida do trećeg egzona ne amplifikuje produkt, a PCR-SSP reakcija za himerni gen sa tačkom prekida do šestog egzona amplifikuje, može se zaključiti da se tačka prekida desila između trećeg i šestog egzona. Poslednji set prajmera čini „forward” prajmer koji je specifičan za sekvencu pseudogena šestog egzona (Ex6P) i „reverse” prajmer specifičan za sekvencu u 3’ UTR *CYP21A2* gena (Ex10N). Amplifikacija produkta specifične dužine od 1812 bp koji se prostire od egzona 6 pseudogena do 3’ UTR aktivnog gena potvrđuje prisustvo

himernog gena sa tačkom prekida između šestog i desetog egzona. Svaki od uzoraka se paralelno testira i na prisustvo normalnog *CYP21A2* alela. Za svaki par prajmera dizajniran za detekciju *CYP21A1P/CYP21A2* himernog gena dizajniran je i par prajmera koji omogućava analognu kontrolnu amplifikaciju normalne sekvence ukoliko do delecije nije došlo. „Reverse” prajmeri za detekciju normalnih alela su isti kao za detekciju himernih gena, ali su „forward” prajmeri umesto za pseudogen specifični za aktivan gen (-302N i Ex6N, tabela 4) čime je omogućena amplifikacija specifičnog produkta aktivnog gena. Istovremenom PCR-SSP reakcijom za detekciju i himernih i normalnih alela moguće je razlikovati pacijente koji su homozigoti za himerne gene od pacijenata koji su heterozigoti sa jednim normalnim alelom.

PCR-SSP reakciona smeša, finalne zapremine 30 μ l, sadržala je:

- 1x KAPA LR pufer (bez Mg²⁺)
- 1,75 mM MgCl₂
- 0,3 mM svakog dNTP
- 1U KAPA LongRange DNK polimeraze (KAPA Biosystems)
- 30 pmol svakog prajmera
- 150 ng genomske DNK

Vremenski i temperaturni profil PCR-SSP reakcije:

94°C / 5min

(94 °C/1min, 62 °C/1min, 68 °C/5min) X 35 ciklusa

72 °C /10min

Amplifikovani PCR produkti su analizirani na 1%-tnom agaroznom gelu zajedno sa pozitivnim kontrolama za svaku od tri klase himernih gena.

3.2.7. *IN SILICO* ANALIZA

Novootkrivene *CYP21A2* varijante, koje nisu nađene pretraživanjem baza podataka (www.hgmd.cf.ac.uk, www.cypalleles.ki.se), su podvrgnute *in silico* analizi upotrebom bioinformatičkih softvera koji predviđaju efekat varijante na funkciju proteina. Proteinske sekvence su preuzete sa sajta Ensemble (<http://www.ensembl.org>). Program Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>) (Sievers i sar., 2011) je korišćen za ispitivanje evolucione očuvanosti izmenjenih aminokiselina. Poravnanjem većeg broja proteinskih sekvenci iz različitih organizama se proverava prisustvo određene aminokiseline na datoj poziciji kod vrsta koje se nalaze na različitom stepenu filogenetske udaljenosti. Za analizu nesinonimnih aminokiselinskih zamena korišćeni su softveri: PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) i MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>). Ovim programima se predviđa da li je ispitivana promena sekvence mutacija koja dovodi do razvoja bolesti ili varijanta koja je neutralna u odnosu na fenotip. PolyPhen-2 predviđa mogući efekat aminokiselinske zamene na strukturu i funkciju humanih proteina, dok SIFT analizira sličnost sekvenci srodnih proteina i ne zahteva informacije o strukturi i funkciji proteina. Swiss-Pdb Viewer program (<http://www.expasy.org/spdbv>) (Arnold i sar., 2006) je korišćen za predviđanje proteinske strukture mutiranog proteina na osnovu teoretskog modela humanog CYP21 zasnovanog na zečjem CYP2C5. Korišćena PDB šifra je 2GEG (<http://www.rcsb.org/pdb>) (Robins i sar., 2006).

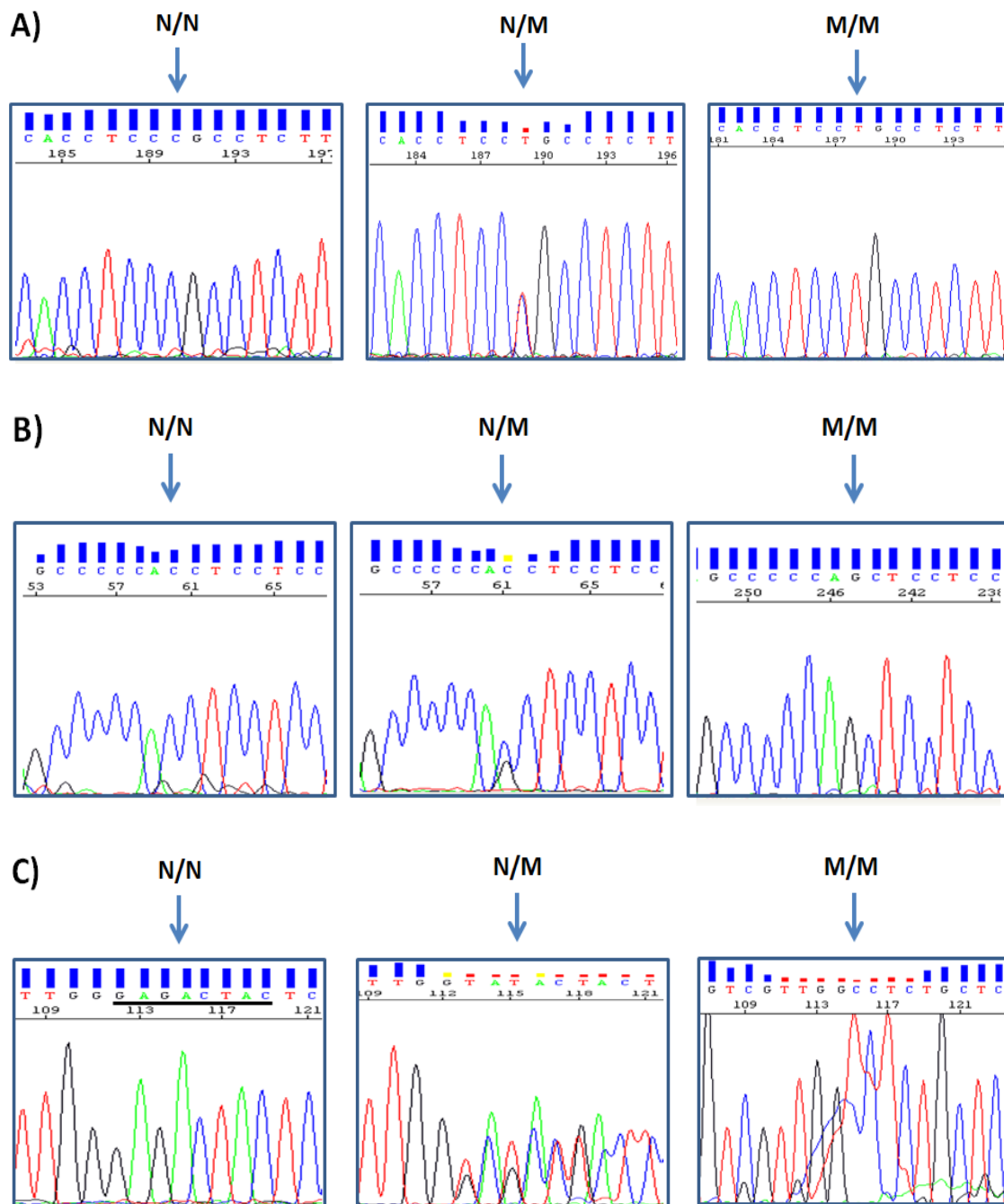
4. REZULTATI

U studiju molekularne karakterizacije gena za steroid 21-hidroksilazu uključeno je 61 nesrodnih pacijenata od kojih je 31,1% (19/61) imalo dijagnozu KAH-a sa gubitkom soli, 24,6% (15/61) jednostavnu virilizujuću formu i 44,3% (27/61) blagu neklasičnu formu. U cilju određivanja ili potvrđivanja genotipa pacijenata vršena je analiza segregacije alela u porodicama, pa su, kad god je bilo moguće, analizirani i uzorci srodnika prvog stepena (roditelja, brance/sestara). Kombinacijom strategije direktnog sekvenciranja *CYP21A2* gena i detekcije himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena PCR-SSP metodom analizirano je 122 hromozoma. Širok spektar patogenih mutacija je identifikovan na 100 hromozoma dajući ukupan nivo detekcije mutacija od 82,0%. Stopa detekcije mutacija kod pacijenata sa KAH-om sa gubitkom soli je bila 94,7% (36/38 alela), 83,3% (25/30 alela) kod pacijenata sa jednostavnom virilizujućom formom i 72,2% (39/54 alela) kod pacijenata sa neklasičnom formom KAH-a. Molekularni defekt u *CYP21A2* genu je identifikovan kod 88,5% (54/61) analiziranih pacijenata, pri čemu zbog ograničenja metode ili nedostatka roditeljskih uzoraka u slučaju četiri patogena hromozoma nije bilo moguće precizno odrediti mutaciju. Ovi hromozomi zajedno sa hromozomima pacijenata kod kojih nije detektovana nijedna mutacija u *CYP21A2* genu 11,5% (7/61) nisu dalje razmatrani prilikom određivanja učestalosti pojedinih *CYP21A2* mutacija u populaciji.

4.1. MUTACIJE U *CYP21A2* GENU

4.1.1. DETEKCIJA MUTACIJA *CYP21A2* GENA

Metodom direktnog sekvenciranja *CYP21A2* gena kod pacijenata sa KAH-om detektovan je celokupan navedeni spektar mutacija specifičnih za pseudogen, kopiranih procesom genske konverzije, ali su detektovane i retke sporadične, kao i nove, do danas neprijavljene mutacije. U analiziranoj grupi pacijenata detektovano je sedam *missense* mutacija koje su dovele do nesinonimne aminokiselinske zamene u proteinskoj sekvenci, jedna *nonsense* mutacija koja je uzrokovala nastanak prevremenog STOP kodona, jedna *splice* mutacija koja je dovela do promene mesta iskrajanja introna, dve *frameshift* mutacije koje su uzrokovale pomeranje okvira čitanja (delecija osam



Slika 13. Prikaz DNK sekvenci delova *CYP21A2* gena sa označenim mutacijama kod pacijenta sa normalnom sekvencom (N/N), pacijenta heterozigota za označenu mutaciju (N/M) i pacijenta homozigota za detektovanu mutaciju (M/M). (A) Deo sekvence prvog egzona *CYP21A2* gena sa *missense* mutacijom p.P30L (c.89C>T) (B) Deo sekvence drugog introna *CYP21A2* gena sa *splice* mutacijom (c.290-13A/C>G) (C) Deo sekvence trećeg egzona *CYP21A2* gena sa malom delecijom p.G110fs (c.329_336delGAGACTAC).

nukleotida i insercija jednog nukleotida), mala konverzija kojom su kopirana tri egzona pseudogena, dok je na tri patogene hromozoma identifikovano više od jedne mutacije. Primeri rezultata sekvenci sa označenim *missense* p.P30L (c.89C>T), *splice* c.290-13A/C>G i *frameshift* p.G110fs (c.329_336delGAGACTAC) mutacijama detektovanim u *CYP21A2* genu su prikazani na slici 13, pri čemu su paralelno date normalne, heterozigotne i homozigotne sekvence.

Direktnim sekvenciranjem nije bilo moguće razlikovati homozigotnost od hemizigotnosti koja se često javlja prilikom analize *CYP21A2* genskog lokusa kao posledica velikih genomskih rearanžmana na jednom od hromozoma. Iz tog razloga, ukoliko je prilikom sekvenciranja primećena homozigotnost, obavezno je vršena i detekcija *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena. Zbog mogućnosti prisustva više mutacija na jednom hromozomu, molekularna studija roditeljskih uzoraka je omogućavala razvrstavanje mutacija na različite hromozome, te je, takođe, analiza roditeljskih gena vršena kadgod je to bilo moguće.

Izuzev promena u sekvenci gena koje dovode do razvoja bolesti sekvenciranjem svih egzona i introna *CYP21A2* gena detektovana je i učestala duža izoforma proteina sa dodatnom leucinskom reziduom, kao i uobičajene aminokiselinske zamene koje ne utiču na funkciju enzima. Tu spadaju varijante p.K102R u egzonu 3, p.S268T u egzonu 7, p.S468G i p.N493S u egzonu 10. U tabeli 5 su prikazane i brojne detektovane tihe tačkaste mutacije kod kojih postoji promena u kodirajućem delu gena, ali zbog izrođenosti DNK koda ne dolazi do promene aminokiseline i same strukture proteina, kao i varijante u intronima i 5' i 3' UTR regionima.

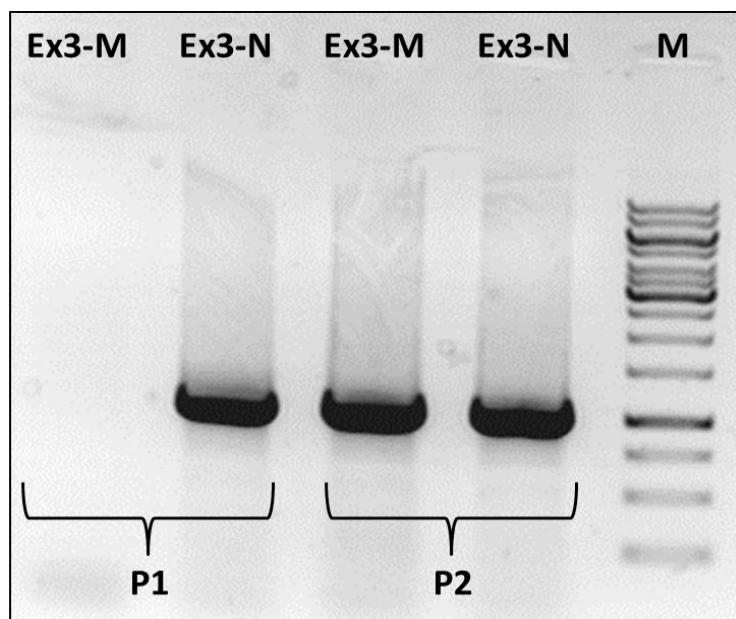
Tabela 5. Tihe mutacije i intronske varijante detektovane u *CYP21A2* genu

Pozicija	Promena na nivou DNK	Promena na nivou proteina
5' UTR	g.-14A>G	
	g.-4C>T	
Egzon 1	c.115C>T	p.L39=
	c.135C>A	p.P45=
Egzon 2	c.270C>A	p.G90=
Intron 2	IVS2+9C>T	
	IVS2+33 A>C	
	IVS2+67C>T	
	IVS2-109 G>C	
	IVS2-45T>C	
Intron 3	IVS3+38C>T	
Intron 4	IVS4-15C>A	
	IVS4-8T>C	
Egzon 6	c.702T>C	p.D234=
Intron 6	IVS6+12,13 AC>GT	
	IVS6-21C>T	
Egzon 7	c.744C>G	p.L248=
Intron 7	IVS7+11G>C	
Egzon 9	c.1122C>T	p.S374=
Egzon 10	c.1470G>A	p.P490=

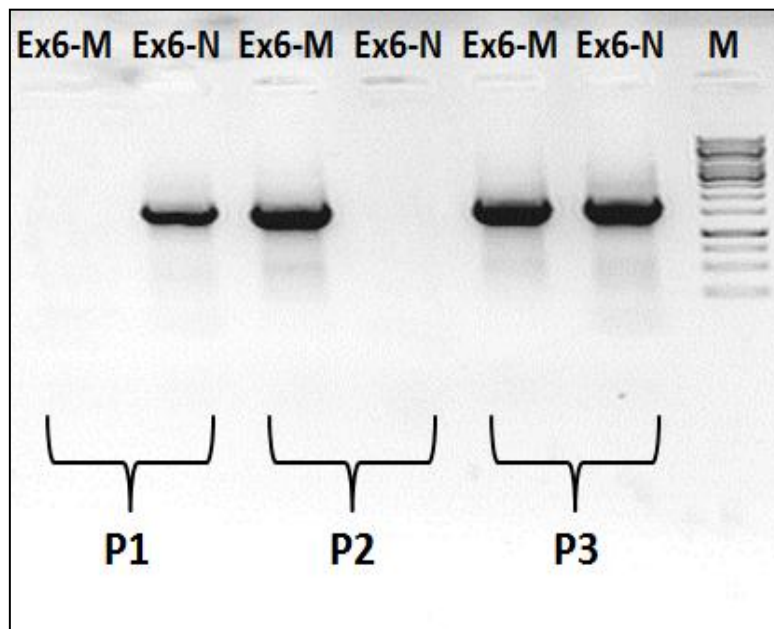
4.1.2. DETEKCIJA HIMERNIH *CYP21A1P/CYP21A2* GENA

Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni sa različitim tačkama prekida koji nastaju u mejozi kao rezultat nejednakog *crossing over*-a analizirani su sa tri PCR reakcije sa prajmerima specifičnim za sekvencu (PCR-SSP). Radi jednostavnosti detekcije i analize himerni geni su aproksimativno podeljeni u tri klase: himerni geni sa tačkom prekida u regionu od -302 do trećeg egzona (CH-Ex3), sa tačkom prekida između trećeg i šestog egzona (CH-Ex6) i tačkom prekida između šestog i desetog egzona (CH-Ex10). Za detekciju svake od ove tri klase himernih gena su korišćena dva seta prajmera: jedan

koji omogućava amplifikaciju specifičnog himernog gena i drugi koji omogućava amplifikaciju fragmenta normalnog gena. Zbog postojanja visokog stepena homologije između aktivnog *CYP21A2* gena i *CYP21A1P* pseudogena precizne tačke prekida nije bilo moguće utvrditi. Na slikama 14, 15 i 16 je prikazan obrazac PCR produkata kod pacijenata testiranih na prisustvo CH-Ex3, CH-Ex6 i CH-Ex10 himernih gena, kako sledi. U Ex3-M, Ex6-M i Ex10-M PCR reakcijama su korišćeni prajmeri koji omogućavaju amplifikaciju odgovarajućih himernih gena, dok su u Ex3-N, Ex6-N i Ex10-N reakcijama korišćeni prajmeri za amplifikaciju normalnih sekvenci.

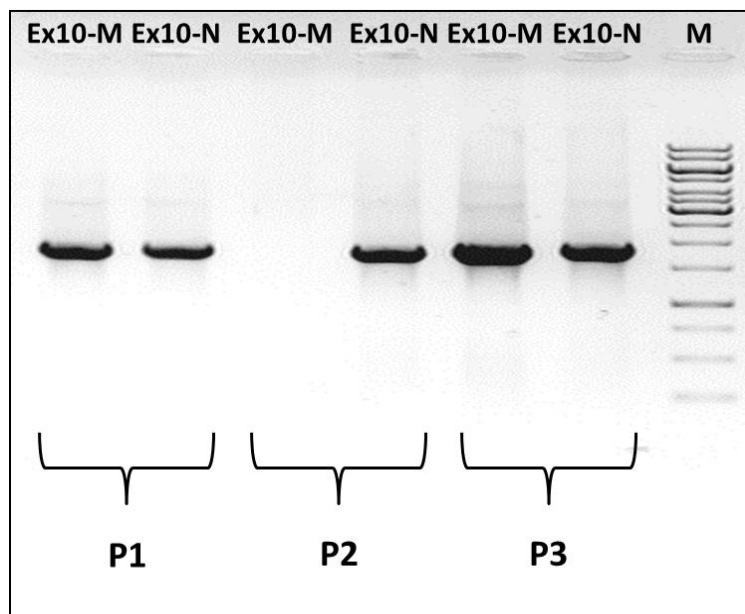


Slika 14. Rezultati PCR-SSP reakcije za detekciju CH-Ex3 himernih gena. Pacijent P1-wt; Pacijent P2-heterozigotni nosilac himernog *CYP21A1P/CYP21A2* gena CH-Ex3; M-DNK marker od 1kb.



Slika 15. Rezultati PCR-SSP reakcije za detekciju CH-Ex6 himernih gena. Pacijent P1-wt; Pacijent P2-homozigot za *CYP21A1P/CYP21A2* himerni gen sa bar jednim CH-Ex6 himernim genom. Analiza drugih himernih gena će utvrditi da li je pacijent homozigot za CH-Ex6 ili se na drugom homologom hromozomu nalazi druga klasa himernih gena; Pacijent P3-heterozigotni nosilac himernog *CYP21A1P/CYP21A2* gena CH-Ex6; M-DNK marker od 1kb.

PCR-SSP reakcija namenjena za detekciju himernih gena sa tačkom prekida od šestog do desetog egzona je uvek amplifikovala i specifični produkt kod pacijanata pozitivnih za p.V281L mutaciju, što je objašnjeno prisustvom dupliciranog *CYP21A1P* gena (Dolžan i sar., 2003).



Slika 16. Rezultati PCR-SSP reakcije za detekciju CH-Ex10 himernih gena. Pacijenti P1 i P3- heterozigotni nosioci himernog *CYP21A1P/CYP21A2* gena CH-Ex10; pacijent P2-wt; M-DNK marker od 1kb.

Ograničenje PCR-SSP metodologije se ogleda u slučaju pacijenata koji su složeni heterozigoti za dva himerna gena sa tačkom prekida do šestog egzona. Naime, pacijenti sa genotipom [CH-Ex3; CH-Ex3] i [CH-Ex3; CH-Ex6] pokazuju isti obrazac PCR traka te je stoga za preciznu determinaciju njihovog genotipa neophodno analizirati roditeljske gene.

Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni su identifikovani kod 12 pacijenata, pri čemu su himerni geni sa tačkom prekida do trećeg egzona (CH-Ex3) detektovani na devet hromozoma, himerni geni sa tačkom prekida između trećeg i šestog egzona (CH-Ex6) na tri hromozoma, a himerni geni sa tačkom prekida između šestog i desetog egzona (CH-Ex10) na dva hromozoma sa patogenim efektom na fenotip.

4.1.3. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U *CYP21A2* GENU

Molekularnom karakterizacijom *CYP21A2* gena u analiziranoj grupi pacijenata identifikovan je celokupan spektar poznatih mutacija specifičnih za pseudogen, sve tri klase *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena, ali su detektovane i retke, kao i dve nove mutacije. Ukupno je detektovano 18 alela sa patogenim efektom. Nakon ekstenzivne analize sekvence *CYP21A2* gena kod 13,1% (8/61) pacijenata je identifikovana mutacija na samo jednom homologom hromozomu.

Najučestaliji uzrok KAH-a kod pacijenata iz Srbije je intronska *splice* mutacija c.290-13A/C>G, detektovana na 20 od 108 analiziranih hromozoma (18,5%), odnosno na skoro jednoj petini svih hromozoma. *Missense* mutacija p.P30L i himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni su se javili sa istom relativnom učestalošću od po 13,0%. Himerni geni sa tačkom prekida do trećeg egzona CH-Ex3 su detektovani sa relativnom učestalošću od 8,3%, a sa učestalostima 2,8% i 1,9% himerni geni sa tačkom prekida između trećeg i šestog (CH-Ex6) i šestog i desetog egzona (CH-Ex10), kako sledi.

Preostali molekularni defekti detektovani u *CYP21A2* genu su imali sledeće učestalosti: p.R356W (11,1%), p.G110fs (7,4%), p.Q318X (4,6%), p.V281L (4,6%), p.I172N (2,8%), p.L307fs (2,8%), p.P453S (1,9%) (slika 17). Spektar detektovanih mutacija u *CYP21A2* genu, njihove karakteristike i učestalosti kod pacijenata sa KAH-om u Srbiji su prikazani u tabeli 6, a na slici 17 je dat grafički prikaz distribucije najučestalijih detektovanih mutacija.

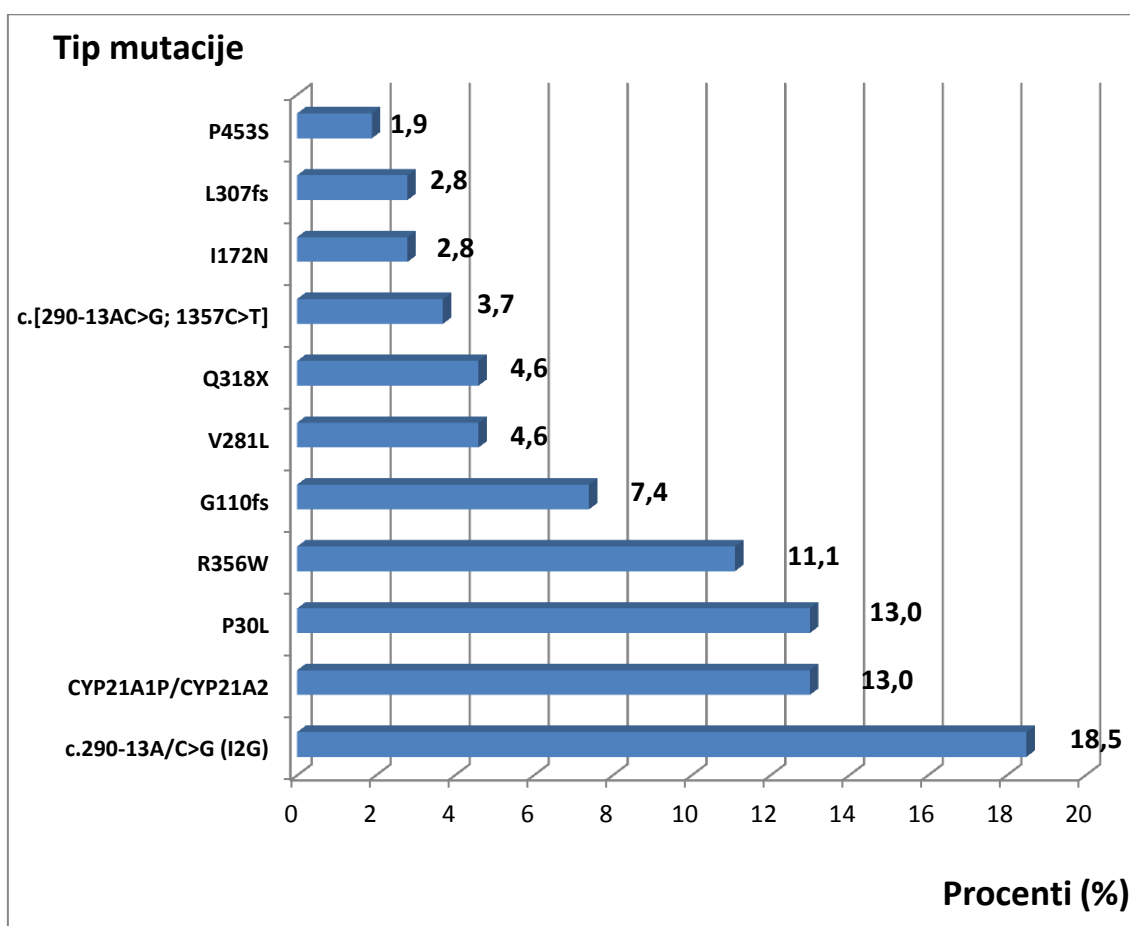
Na osam hromozoma su u *CYP21A2* genu detektovane višestruke mutacije (7,4%), pri čemu je sedam hromozoma (6,5%) imalo dve, a jedan hromozom (0,9%) više od dve mutacije. Dva kompleksna alela sadržala su i mutacije koje su nastale *de novo*: c.[290-13A/C>G; 841G>T] i mala konverzija Ex6-Ex8. U prvom slučaju pacijent je na jednom hromozomu imao c.290-13A/C>G mutaciju, a na drugom c.[290-13A/C>G; 841G>T], pri čemu je majka bila nosilac p.V281L (c.841G>T) mutacije, a uзорak oca nije bio dostupan za analizu. S obzirom da je kod deteta na oba hromozoma detektovana c.[290-13A/C>G] mutacija zaključeno je da je ona morala nastati *de novo* u oogenezi. Kod drugog pacijenta na jednom hromozomu je detektovana Ex6-Ex8

Tabela 6. Spektar i učestalost mutacija u *CYP21A2* genu koje uzrokuju KAH kod pacijenata u Srbiji

<i>CYP21A2</i> mutacije	Trivijalna nomenklatura	Egzon/Intron	Broj alela	Relativna učestalost (%)	Tip mutacije	Aktivnost enzima⁴ (%)
CH-Ex3	velika konverzija	Promotor i egzoni 1-2	9	8,3	velika delecija	Varijabilna ³
CH-Ex6	velika konverzija	Promotor i egzoni 1-5	3	2,8	velika delecija	0
CH-Ex10	velika delecija	Promotor i egzoni 1-10	2	1,9	velika delecija	0
p.P30L (c.89C>T)	P30L	Egzon 1	14	13	missense	20-30
-	I2G ili IVS2-13A/C>G	Intron 2	20	18,5	splice	0-1
p.G110fs (c.329_336del)	Del8bp	Egzon 3	8	7,4	frameshift	0
p.L129P ¹ (c.386T>C)	-	Egzon 3	1	0,9	missense	Neodređeno
p.S165P ¹ (c.493T>C)	-	Egzon 4	1	0,9	missense	Neodređeno
p.I172N (c.515T>A)	I172N	Egzon 4	3	2,8	missense	1-5
p.V281L (c.841G>T)	V281L	Egzon 7	5	4,6	missense	30-50
p.L307fs (c.920_921insT)	F306+T	Egzon 7	3	2,8	frameshift	0
p.Q318X (c.952C>T)	Q318X	Egzon 8	5	4,6	nonsense	0
p.R356W (c.1066C>T)	R356W	Egzon 8	12	11,1	missense	0
p.P453S (c.1357C>T)	P453S	Egzon 10	2	1,9	missense	30-50
p.[P30L; P453S]	P30L, P453S		2	1,9	kompleksan alel	
c.[89C>T; 1357C>T]			4	3,7	kompleksan alel	
c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	I2G, P453S		1	0,9	kompleksan alel	
c.[290-13A/C>G; 841G>T]	I2G, V281L		1	0,9	kompleksan alel	
p.[I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W]	Ex6-Ex8 konverzija		1	0,9	kompleksan alel	
c.[707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT; 952C>T; 1066C>T]			4	3,7		
Dodatni defektni aleli ²			8	7,4		
Bez mutacija			108	100		
Ukupno						

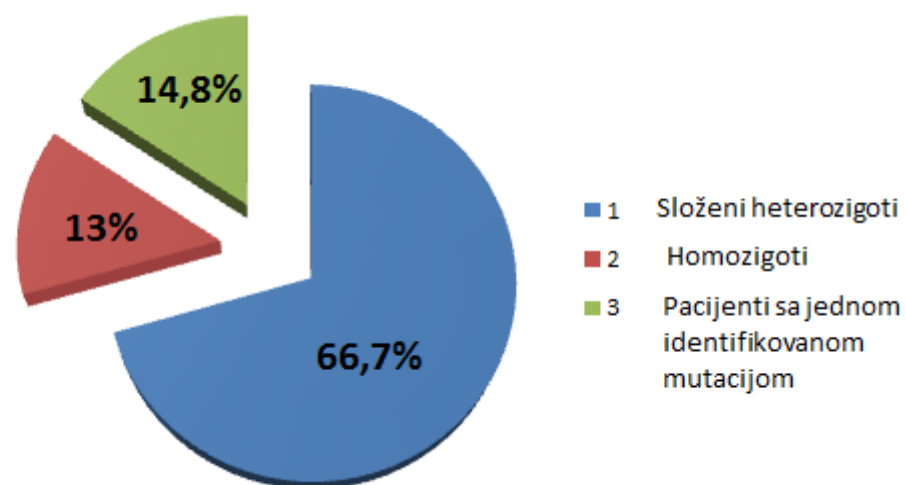
¹Nove mutacije prvi put detektovane u ovoj studiji. ²Neodređeni aleli zbog nemogućnosti analize roditeljskih gena ili ograničenja metode. ³Prema Chen i sar. (2012) u zavisnosti od tačke prekida rezultujući *CYP21A1P/CYP21A2* hierni protein može imati različite enzimatske aktivnosti. Ukoliko hierni gen sadrži c.290-13A/C>G mutaciju aktivnost enzima će biti potpuno narušena, međutim ukoliko je tačka prekida locirana između prvog egzona i drugog introna, uzvodno od c.290-13A/C>G mutacije, hierni enzim će zadržati parcijalnu aktivnost i rezultovaće blažim fenotipom. ⁴Aktivnost enzima prema Krone i Arlt, 2009.

konverzija odnosno složeni p.[I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W] alel, a na drugom p.P453S mutacija. Kod oca je potvrđeno prisustvo p.P453S mutacije, dok kod majke nije detektovana nijedna patogena mutacija. Analizom segregacije alela u porodici preostalih šest složenih haplotipova je identifikovano i kod roditelja. Mutacija koja se najčešće javila u haplotipu sa drugim mutacijama (u čak 75,0% hromozoma sa složenim alelima) bila je p.P453S. Interesantno je da je pojedinačno pomenuta mutacija prisutna na samo dva hromozoma sa patogenim efektom (1,9%), dok je na čak šest hromozoma kopirana *en bloc* sa c.290-13A/C>G (3,7%) odnosno p.P30L (1,9%) mutacijom.



Slika 17. Distribucija učestalih mutacija u *CYP21A2* genu kod pacijenata iz Srbije.

Na pet hromozoma sa patogenim efektom na fenotip (4,6%) detektovano je prisustvo mutacija koje nisu potvrđene u roditeljskim genima sugerišući da se radi o *de novo* mutacijama. Jedina detektovana tačkasta *de novo* mutacija, prisutna na čak tri hromozoma, je bila c.290-13A/C>G. Analiza roditeljskih gena je sugerisala da je mutacija u dva slučaja nastala u oogenezi, dok za trećeg pacijenta nije bilo moguće utvrditi njeno poreklo. Preostala dva *de novo* alela su: *CYP21A1P/CYP21A2* himerni gen sa tačkom prekida do šestog egzona (CH-Ex6 gen) najverovatnije nastao kao rezultat nejednakog CO-a i Ex6-Ex8 konverzija kojom su iz pseudogena u aktivan gen kopirani šesti, sedmi i osmi egzon. Zbog visokog stepena homologije aktivnog *CYP21A2* gena i *CYP21A2P* pseudogena nije bilo moguće ustanoviti precizne tačke prekida ovih novih mutacionih događaja. Važno je napomenuti, pritom, i da potvrđivanje majčinstva i očinstva analizom mikrosatelita (markera) nije vršeno.



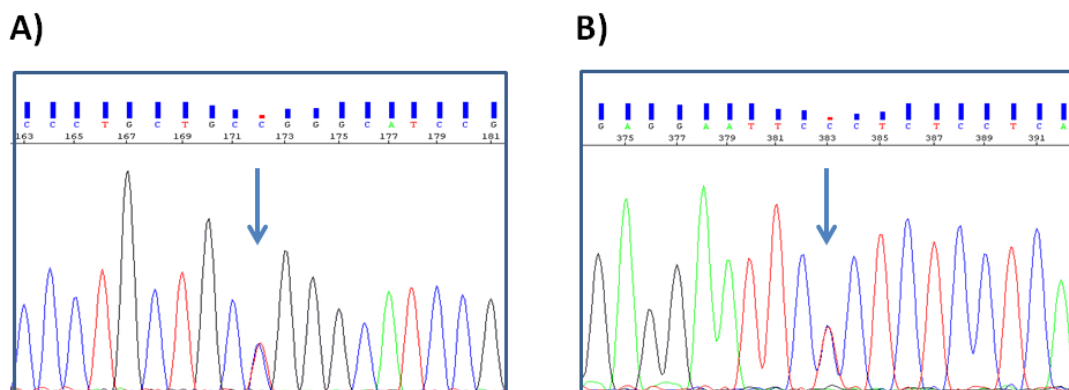
Slika 18. Distribucija složenih heterozigota, homozigota i pacijenata sa jednom detektovanom mutacijom.

Od 54 pacijenata sa detektovanim mutacijama u *CYP21A2* genu oko dve trećine su bili složeni heterozigoti (66,7%), pacijenti sa samo jednom detektovanom mutacijom su činili 14,8% analiziranih pacijenata, dok su se homozigoti javili sa učestalošću od 13,0% (slika 18). Kod preostalih pacijenata genotip nije bilo moguće utvrditi zbog

ograničenja metode ili prisustva višestrukih mutacija, a nemogućnosti analize roditeljskih gena. Kao što je i očekivano, većina homozigotnih pacijenata imala je najučestalije c.290-13A/C>G i p.P30L mutacije, dok je jedan pacijent bio homozigot za malu deleciju p.G110fs, a jedan za redak kompleksan alel c.[290-13A/C>G; 1357C>T].

4.1.4. NOVE VARIJANTE U *CYP21A2* GENU

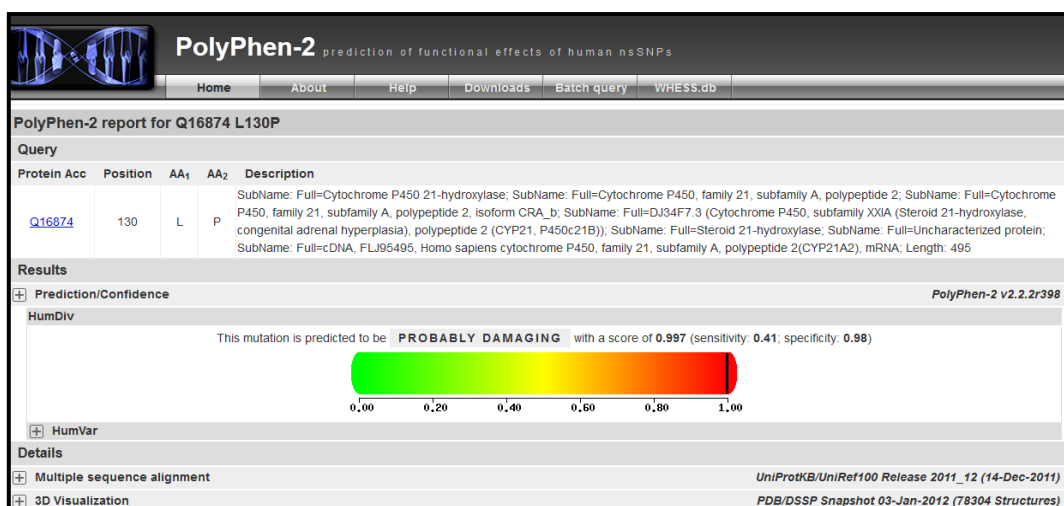
Dva od 18 detektovanih patogenih alela do danas nisu prijavljena u odgovarajućim bazama podataka i dostupnoj literaturi. Nove mutacije c.386T>C (p.L129P) i c.493T>C (p.S165P) su locirane u trećem i četvrtom egzonu *CYP21A2* gena, kako sledi (slika 19). Oba alela su detektovana u pojedinačnim porodicama i njihovo prisustvo je potvrđeno kod roditelja. Mutacija p.L129P je detektovana kod pacijenta sa teškim oblikom KAH-a sa gubitkom soli, koji na drugom alelu ima c.[290-13A/C>G; 1357C>T], a mutacija p.S165P je detektovana kod pacijenta sa blagom nekласičnom formom bolesti, koji na drugom alelu ima p.I172N.



Slika 19. (A) DNK sekvenca dela egzona 3 *CYP21A2* gena kod pacijenta koji je heterozigotni nosilac novodetektovane mutacije c.386T>C (p.L129P); (B) DNK sekvenca dela egzona 4 *CYP21A2* gena kod pacijenta koji je heterozigotni nosilac novodetektovane mutacije c.493T>C (p.S165P).

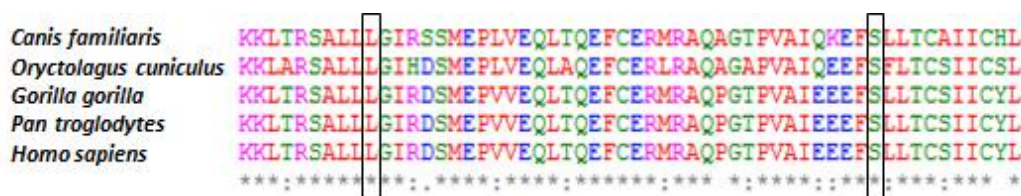
Patogeni efekat datih mutacija procenjen je *in silico* analizama upotrebom PolyPhen-2, SIFT i MutPred bioinformatičkih programa. Ovi softverski programi omogućavaju predikciju uticaja zamene aminokiselina na strukturu i funkciju proteina. Kod sva tri programa skor može imati vrednosti od 0 do 1, pri čemu vrednosti bliže nuli označavaju najverovatnije benigne, dok vrednosti bliže jedinici označavaju promene koje najverovatnije narušavaju funkciju proteina. Izuzetak je SIFT program kod koga su najverovatnije benigne promene predviđene vrednostima bližim jedinici, a patogene promene vrednostima bližim nuli.

Za obe mutacije, p.L129P i p.S165P, PolyPhen-2 skor je bio isti 0,997 (slika 20), predviđajući da su one verovatno štetne. SIFT skor za p.L129P je bio 0,01 čime je potvrđen štetan efekat ove promene na proteinsku funkciju, dok je za mutaciju p.S165P skor bio 0,08 predviđajući funkcionalni efekat koji je tolerisan. MutPred verovatnoća štetnosti mutacija je bila 0,595 za p.L129P (sa $p=0,0394$ gain of disorder) i 0,633 za p.S165P, dajući potvrdu da su mutacije verovatno patogene.



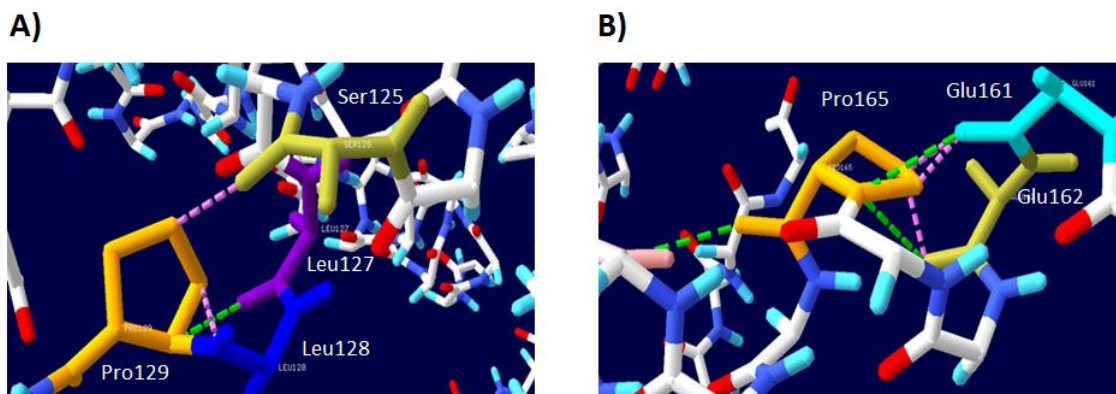
Slika 20. Predikcija efekta p.L129P aminokiselinske zamene na funkciju CYP21A1 proteina sa PolyPhen-2 programom.

U cilju određivanja evolucione očuvanosti zamenjenih aminokiselina izvršeno je poravnanje aminokiselinskih sekvenci steroid 21-hidroksilaze pet odabranih organizama sa Clustal Omega programom. Ova analiza je ukazala na evolucionu očuvanost Leu129 i Ser165 rezidua među CYP21A2 ortolozima (slika 21).



Slika 21. Analiza evolucione očuvanosti aminokiselina leucina i serina na pozicijama 129 i 165, kako sledi, među CYP21A2 ortolozima uz pomoć Clustal Omega programa. Simbolom zvezdice (*) su označene pozicije na kojima se nalaze evoluciono očuvane aminokiseline, dok su ciljane aminokiseline uokvirene. Redom su poravnate sekvence dela CYP21A2 proteina iz sledećih organizama: *Canis familiaris* (domaći pas), *Oryctolagus cuniculus* (patuljasti kunić), *Gorilla gorilla* (gorila), *Pan troglodytes* (šimpanza) i *Homo sapiens* (čovjek).

Trodimenzijski molekularni model CYP21A2 proteina, konstruisan i analiziran *Swiss-Pdb* viewer programom, pokazao je da se Leu129 nalazi u petlji između C-heliksa i D-heliksa, dok je Ser165 lociran u E-heliksu CYP21A2 proteina. Na slici 22 su prikazani regioni proteina koji sadrže aminokiseline na pozicijama 129 i 165. U slučaju zamene aminokiseline lizin prolinom na poziciji 129 vodonična veza sa Leu127 (označenim ljubičastom bojom) je ostala nepromenjena, ali je prisustvo rigidne prolinske rezidue na ovoj poziciji izazvalo sterne smetnje sa Ser125 (označenim zelenom bojom) i Leu128 (tamno plavom). U slučaju mutacije p.S165P, vodonične veze sa Cys169 (označenim svetlo roze bojom), Glu161 (tirkiz) i Glu162 (zelenom) su ostale nepromenjene, ali je zamena sa prolinom i ovde dovela do sternih smetnja sa poslednje dve aminokiseline.



Slika 22. Trodimenzionalni molekularni CYP21A2 model - prikaz interakcija zamenjenih aminokiselina 1) sa prolinom na poziciji 129. 2) sa prolinom na poziciji 165. Varijantna aminokiselina je prikazana svetlo narandžastom bojom, vodonične veze su predstavljene zelenim isprekidanim crticama, dok je „sudaranje” prikazano ljubičastim isprekidanim crticama.

4.2. KORELACIJA GENOTIPA *CYP21A2* GENA I FENOTIPA KAH-A

Na osnovu kliničke slike i hormonskih vrednosti pacijenti su klasifikovani u odgovarajuće fenotipske kategorije. Dijagnozu blage neklasične forme bolesti je imalo 27 pacijenata, 15 je imalo jednostavnu virilizujuću i 19 pacijenata formu sa gubitkom soli. Identifikovan je 31 različit genotip i analizirana je korelacija *CYP21A2* genotipa i fenotipa kod pacijenata obolelih od KAH-a u Srbiji (tabela 7).

U grupi pacijenata sa najblažom neklasičnom formom KAH-a najučestalija detektovana mutacija je bila p.P30L (25,0%), zatim p.R356W (13,6%) i p.V281L (9,0%) (Tabela 7). U skladu sa tim, najučestaliji detektovani genotipovi su bili homozigoti za p.P30L i složeni heterozigoti p.[P30L];[R356W]. Kod pacijenata sa jednostavnom virilizujućom formom KAH-a najučestalija mutacija je c.290-13A/C>G (26,9%), zatim CH-Ex3 himerni gen (15,4%) i p.P30L (11,5%), dok su najučestaliji genotipovi pored c.290-13A/C>G mutacije imali i himerni CH-Ex3 gen.

Tabela 7. Učestalost mutacija u *CYP21A2* genu podjeljena prema fenotipskim klasama

<i>CYP21A2</i> mutacije ¹ Proteinska/ nukleotidna varijacija	Trivijalna nomenklatura	SW	SV	NC	Ukupno
CH-Ex3	velika konverzija	1	4	4	9
CH-Ex6	velika konverzija	2	1		3
CH-Ex10	velika delecija	1		1	2
p.P30L (c.89C>T)	P30L		3	11	14
- (c.290-13A/C>G)	IVS2-13A/C>G ili I2G	9	7	4	20
p.G110fs (c.329_336del)	Del8bp	6		2	8
p.L129P ² (c.386T>C)	-	1			1
p.S165P ² (c. 493T>C)	-			1	1
p.I172N (c.515T>A)	I172N		2	1	3
p.V281L (c.841G>T)	V281L		1	4	5
p.L307fs (c.920_921insT)	F306+t	1		2	3
p.Q318X (c.952C>T)	Q318X	3	1	1	5
p.R356W (c.1066C>T)	R356W	4	2	6	12
p.P453S (c.1357C>T)	P453S	1	1		2
p.[P30L; P453S] c.[89C>T; 1357C>T]	P30L, P453S	1		1	2
- c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	I2G, P453S	3	1		4
- c.[290-13A/C>G; 841G>T]	I2G, V281L	1			1
p.[I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W] c.[707T>A; 710T>A; 716T>A; 841G>T; 920_921insT; 952C>T; 1066C>T]	Ex6-Ex8 konverzija		1		1
Dodatni patogeni aleli ³		2	1	1	4
Ukupno detektovano		36	25	39	100
Aleli bez identifikovanih mutacija		2	1	5	8
Ukupno		38	26	44	108

¹ Nomenklatura, ² Nove mutacije, ³ Mutacije koje nisu mogle biti distribuirane na različite alele zbog ograničenja metode i/ili nemogućnosti analize roditeljskih uzoraka.

Mutacija c.290-13A/C>G takođe je bila najučestalija i kod pacijenata sa najtežom formom KAH-a (36,8%), detektovana na čak 14 hromozoma, bilo kao pojedinačna mutacija (23,7%) ili u sklopu složenih haplotipova (10,5%). Pored nje, po

učestalosti su se izdvojile i p.G110fs (15,8%), p.R356W (10,5%), a najučestaliji genotip je bio c.[290-13A/C>G];c.[329_336del].

Na osnovu očekivane enzimatske aktivnosti genotipovi su klasifikovani u „null”, „A”, „B”, „C” i „D” mutacionu grupu. Pacijenti sa genotipovima na osnovu kojih nije bilo moguće predvideti fenotip su svrstani u grupu „D” i nisu analizirani. Tu spadaju pacijenti kod kojih su detektovane nove mutacije nepoznate *in vitro* aktivnosti enzima, pacijenti sa samo jednom detektovanom mutacijom i pacijenti sa CH-Ex3 himernim genom kada na drugom homologom hromozomu nije prisutna blaga mutacija grupe „C” koja bi uslovlila najblaži fenotip. Obzirom da nije određivano da li himerni CH-Ex3 geni sadrže i c.290-13A/C>G mutaciju u takvim slučajevima je bilo nemoguće predvideti enzimatsku aktivnost i fenotipski ishod. Aleli sa višestrukim mutacijama su klasifikovani prema najtežoj mutaciji haplotipa (tabela 8).

Prisustvo bar jedne teške mutacije (himerni *CYP21A1P/CYP21A2* gen, c.290-13A/C>G, p.G110fs, p.[I236N; V237E; M239K], p.L307fs, p.Q318X, p.R356W) je pokazano kod 42 pacijenta (77,8%), dok je i u grupi pacijenata sa blagom neklasičnom formom teška mutacija detektovana u visokom procentu (51,9%).

Nakon ekstenzivne analize sekvenciranjem *CYP21A2* gena kod osam pacijenata, šest ženskih i dva muška, identifikovana je samo jedna patogena mutacija. Pet pacijenata je imalo dijagnozu blage neklasične forme KAH-a, a tri pacijenta su imala dijagnozu klasične forme, od čega dva formu sa gubitkom soli, a jedan jednostavnu virilizujuću formu. Kod tri pacijenta jedina detektovana mutacija je bila p.R356W mutacija, kod dva p.V281L mutacija, a preostala tri pacijenta su imala himerni CH-Ex3 gen, p.Q318X i c.290-13A/C>G mutaciju. Od sedam pacijenata kod kojih nije identifikovana nijedna patogena mutacija pet je bolovalo od neklasične forme bolesti, a dva od jednostavne virilizujuće forme bolesti.

Tabela 8. Genotip *CYP21A2* gena i fenotip KAH-a u analiziranoj grupi pacijenata

Mutaciona grupa	Alel 1	Alel 2	Broj pacijenata	Fenotip		
				SW	SV	NC
Null	CH-Ex6	p.R356W	1	1		
	CH-Ex10	p.R356W	1	1		
	p.Q318X	p.L307fs	1			1
	p.G110fs	p.L307fs	1	1		
	p.G110fs	p.G110fs	1	1		
A	c.290-13A/C>G	p.Q318X	3	2	1	
	c.290-13A/C>G	p.R356W	1		1	
	c.290-13A/C>G	[c.290-13A/C>G; 841G>T]	1	1		
	c.290-13A/C>G	c.290-13A/C>G	3	1	1	1
	c.290-13A/C>G	p.G110fs	3	3		
	c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	p.R356W	1	1		
	c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	1	1		
B	p.I172N	c.290-13A/C>G	1		1	
	p.I172N	c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	1		1	
C	p.P30L	CH-Ex10	1			1
	p.P30L	CH-Ex3	1			1
	p.P30L	p.P30L	3		1	2
	p.P30L	p.L307fs	1			1
	p.P30L	p.G110fs	1			1
	p.P30L	c.290-13A/C>G	1			1
	p.P30L	p.R356W	3		1	2
	p.V281L	p.R356W	1			1
	p.V281L	p.G110fs	1			1
	p.P453S	c.290-13A/C>G	1	1		
D²	p.P453S	Ex6-Ex8 konverzija	1		1	
	CH-Ex3	CH-Ex6	2	1	1	
	CH-Ex3	p.R356W	1			1
	CH-Ex3	c.290-13A/C>G	2		2	
	CH-Ex3	p.[P30L; P453S]	1			1
	p.S165P ¹	p.I172N	1			1
	p.L129P ¹	c.[290-13A/C>G; 1357C>T]	1	1		
Pacijenti sa jednom mutacijom			8	2	1	5
Ukupno			51	18	12	21

¹ Novi genotip, ² Pacijenti koji nisu klasifikovani zbog nemogućnosti predviđanja enzimatske aktivnosti.

5. DISKUSIJA

Ova studija predstavlja prvu kompletnu analizu mutacija u *CYP21A2* genu kod pacijenata obolelih od kongenitalne adrenalne hiperplazije u Srbiji. Upotrebom metoda PCR-SSP i direktnog sekvenciranja *CYP21A2* gena određen je spektar i učestalost *CYP21A2* mutacija i analizirana je korelacija genotipa *CYP21A2* gena i fenotipa kod 61 nesrodna pacijenta kojima je KAH dijagnostifikovan u tri referentna beogradska zdravstvena centra, čime je obezbeđena reprezentativna grupa i pedijatrijskih i pacijenata sa kasnim ishodom bolesti.

5.1. SPEKTAR I UČESTALOST MUTACIJA U GENU *CYP21A2* KOD PACIJENATA OBOLELIH OD KAH-A U SRBIJI

Molekularno-genetičkom analizom *CYP21A2* gena detektovano je 18 patogenih alela od kojih su dva prijavljena prvi put. Izuzev novih mutacija, spektar detektovanih mutacija je u saglasnosti sa prijavljenim mutacijama u drugim evropskim zemljama, dok su izvesne razlike primećene kada su razmatrane njihove učestalosti (tabela 9).

Najčešće detektovana mutacija u *CYP21A2* genu koja se kod pacijenata sa kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom u Srbiji javila sa relativnom učestalošću od 18,5% je c.290-13A/C>G. Supstitucija A/C>G aktivira kriptično mesto za iskrajanje drugog introna, dovodi do promene okvira čitanja, nastanka prevremenog STOP kodona na poziciji 102 aminokiseline i prevremene terminacije translacije koja za rezultat ima skoro potpun gubitak enzimske aktivnosti (Higashi i sar., 1985; Higashi i sar., 1991). Ova mutacija je najučestalija mutacija specifična za pseudogen u većini populacija evropskih zemalja (tabela 9), a zbog efekta osnivača jedina je mutacija koja uzrokuje KAH u geografski izolovanoj populaciji Jupiko Eskima (Wilson i sar., 2007). Poređenjem učestalosti ove mutacije u različitim populacijama primećeno je da je u populaciji iz Srbije detektovana niža učestalost u odnosu na većinu susednih zemalja (Hrvatska 34,9%; Makedonija 35,2%; Mađarska 35,9%; Rumunija 43,9%), ali je slična sa učestalostima prijavljenim za Sloveniju (16,7%), Italiju (19,9%) i Tursku (22,0%).

Tabela 9. Poređenje učestalosti mutacija u *CYP21A2* genu u Srbiji sa učestalostima u drugim slovenskim i evropskim zemljama

Zemlja	Velike delecije	p.P30L	c.290- 13A/C>G	p.G110fs	p.I172N	E6 klaster	p.V281L	p.L307fs	p.Q318X	p.R356W	p.P453S	Referenca
Srbija	13,0	13,0	18,5	7,4	2,8	0	4,6	2,8	4,6	11,1	1,9	Milačić i sar., 2015
Slovenija	48,5	4,6	16,7	0	7,6	0	3,0	1,5	3	0	1,5	Dolžan i sar., 2003
Hrvatska	18,8	5,9	34,9	2,2	11,3	2,2	0	0	4,8	16,7	0	Dumic i sar., 2017
Makedonija	-	18,0	35,2	0	3,3	0	4,1	0	10,7	2,5	-	Anastasovska i sar., 2015
Grčka	13,5	11,3	29,3	2,3	13,5	0	10,8	0	8,6	0,5	3,6	Dracopoulou i sar., 2001
Rumunija	16,7	7,6	43,9	0	12,1	0	0	0	0	1,5	0	Sido i sar., 2005
Mađarska	24,5	3,0	35,9	-	14,1	-	5,6	3,7	1,9	3,0	1,1	Dolžan i sar., 2005
Češka	38,6	3,5	24,0	1,2	11,2	0	9,3	0	3,5	3,9	0	Vrzalová i sar., 2010
Slovačka	22,2	-	50,0	11,1	8,3	-	-	-	2,8	-	-	Dolžan i sar., 2005
Austrija	33,3	9,2	21,7	-	22,5	-	3,3	-	3,3	4,2	0,8	Dolžan i sar., 2005
Turska	20,9	0	22,0	4,4	9,9	2,2	7,6	-	3,3	8,8	2,2	Baş i sar., 2009
Nemačka	27,4	2,6	30,3	1,6	19,7	1,0	2,9	0,3	4,8	4,5	0,3	Krone i sar., 2000
Velika Britanija	45,0	0	30,3	-	7,0	0	0	0	0	9,8	0	Lako i sar., 1999
Italija	-	2,7	19,9	0	6,2	0	11,0	-	8,2	0	-	Carrera i sar., 1996
Španija	19,7	2,6	22,4	3,9	1,3	0	15,8	-	3,9	3,9	-	Ezquieta i sar., 1995

-mutacija nije analizirana

Drugo mesto po učestalosti dele *missense* mutacija p.P30L i velike delecije koje rezultuju stvaranjem himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena, detektovane sa učestalošću od po 13,0%. Zajedno, one su detektovane na više od jedne četvrtine patogenih hromozoma. Učestalost p.P30L mutacije, karakteristične za blagu nekласičnu formu KAH-a, je slična onoj prijavljenoj u Grčkoj 11,3% i Austriji 9,2% (tabela 9). Izuzev Makedonije gde je prijavljena viša učestalost (18,0%), u većini drugih evropskih zemalja zabeležena je niža učestalost (Rumunija 7,6%; Hrvatska 5,9%; Slovenija 4,6%; Češka 3,5%; Mađarska 3,0%; Italija 2,7%; Španija 2,6%), dok u Turskoj i Velikoj Britaniji ova mutacija nije detektovana ni kod jednog analiziranog pacijenta.

Velike *CYP21* genske delecije koje stvaraju himerne *CYP21A1P/CYP21A2* gene su takođe detektovane na 13,0% nesrodnih alela. PCR-SSP reakcije su omogućile razlikovanje tri klase himernih gena sa različitim tačkama prekida: himerne gene CH-Ex3 (8,3%), himerne gene CH-Ex6 (2,8%) i himerne gene CH-Ex10 (1,9%). Ukupna učestalost sve tri klase himernih gena je dosta niža od prijavljene za Sloveniju (48,5%), kao i za većinu drugih evropskih populacija (Češka 38,6%; Austrija 33,3%; Nemačka 27,4%; Mađarska 24,5%; Turska 20,9%; Hrvatska 18,8%; Rumunija 16,7%). Posebno velika razlika je zapažena u poređenju sa učestalostima za populacije severnoevropskih i zapadnoevropskih zemalja kao što su Velika Britanija gde su velike delecije prisutne na čak 45,0% patogenih hromozoma (tabela 9), zatim Finska (43,9%) (Jääskeläinen i sar., 1997), Danska (36,0%) (Ohlsson i sar., 1999) i Švedska (32,2%) (Wedell i sar., 1994).

Kao specifično obeležje populacije iz Srbije može se smatrati visoka učestalost teške *missense* p.R356W mutacije detektovane u analiziranoj grupi pacijenata sa učestalošću od 11,1%. Iz tabele 9 može se primetiti da je učestalost pomenute mutacije u većini drugih evropskih zemalja niža ili potpuno odsustvuje (Slovenija i Italija, bez mutacije; Grčka 0,5%; Rumunija 1,5%; Makedonija 2,5%; Mađarska 3,0%; Češka 3,9%; Španija 3,9%; Nemačka 4,5%), dok su jedine populacije sa sličnom ili višom zabeleženom učestalošću turska (8,8%) i hrvatska populacija (16,7%), sa kojima je naša populacija geografski i genetički povezana. Slično, učestalost p.G110fs mutacije, delecije osam nukleotida u trećem egzonu koja rezultuje promenom okvira čitanja, je viša (7,4%) u poređenju sa okolnim zemljama (Slovenija, Makedonija, Rumunija i Italija, bez mutacije; Hrvatska 2,2%), kao i sa većinom drugih evropskih populacija (Nemačka 1,6%; Grčka 2,3%; Španija 3,9%; Turska 4,4%).

Pet opisanih najučestalijih mutacija kod pacijenata iz Srbije je prisutno na skoro dve trećine (63,0%) alela koji uzrokuju oboljenje, dok je za preostalu trećinu odgovorno 13 patogenih alela koji su svi detektovani sa učestalošću manjom od 5%. Klaster koji se sastoji od tri *missense* mutacije p.[I236N; V237E; M239K] u egzonu šest pseudogena nijednom nije detektovan kao pojedinačni događaj genske konverzije, već samo u okviru male konverzije Ex6-Ex8 kojom je kopiran veći kontinuirani region pseudogena sa više mutacija.

Vodeći uzrok blage deficijencije steroid 21-hidroksilaze i neklasične forme KAH-a u svetu, *missense* mutacija p.V281L, u Srbiji je detektovana sa učestalošću od 4,6%. Navedena učestalost je manja od učestalosti u pojedinim evropskim populacijama kao što su španska (15,8%), italijanska (11,0%), grčka (10,8%), turska (7,6%), a veća od učestalosti u većini preostalih balkanskih zemalja. Posebno je učestala kod Aškenazi Jevreja (63,0%) (Wilson i sar., 2007), dok u Japanu (Tajima i sar., 1998), Indiji (Marumudi i sar., 2012) i kod nativnih Amerikanaca (Wilson i sar., 2007) nije detektovana uopšte. Podjednaku učestalost (4,6%) je pokazala i *nonsense* mutacija p.Q318X koja rezultuje prevremenim STOP kodonom i najtežim tipom KAH-a. Izuzev u Tunisu, gde je ova mutacija najučestalija (35,3%), verovatno kao posledica efekta osnivača (Kharrat i sar., 2004), i Brazilu (25,7%) (Campos i sar., 2009), slična učestalost je zabeležena u većini drugih populacija.

Jedina mutacija specifično asocirana sa jednostavnom virilizujućom formom KAH-a, mutacija p.I172N, detektovana je na 2,8% nesrodnih hromozoma, što je niže od prijavljenih učestalosti za većinu evropskih populacija (tabela 9).

Retka sporadična mutacija p.P453S koja ne vodi poreklo iz pseudogena, a prisutna je u mnogim populacijama, detektovana je kao pojedinačna mutacija sa učestalošću 1,9%. Ova *missense* mutacija je retka i u većini drugih populacija (tabela 9) (Grčka 3,6%, Turska 2,2%, Slovenija 1,5%, Mađarska 1,1%), dok u Hrvatskoj, Rumuniji, Češkoj i Velikoj Britaniji nije uopšte detektovana.

Kada poredimo učestalosti mutacija u različitim populacijama važno je napomenuti da različita zastupljenost tri kliničke forme bolesti u analiziranoj grupi pacijenata u publikovanim studijama može uticati na primećene sličnosti/razlike u učestalostima detektovanih mutacija. Takođe, do odstupanja u zabeleženim učestalostima mutacija može dovesti i izostanak analize velikih genomskih rearanžmana (himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena), te se veća učestalost određenih mutacija u tom slučaju može pripisati prividnoj homozigotnosti.

Molekularno-genetička studija *CYP21A2* gena kod pacijenata iz Srbije je pokazala i prisustvo visokog procenta *de novo* mutacija (4,6%), kao i različitih alelskih varijacija poznatih mutacija (7,4%). Kod četiri od pet pacijenata kod kojih je detektovana *de novo* mutacija, analiza genotipa roditelja je ukazala na odsustvo promene u *CYP21A2* genu majke, sugerišući da se mutacija morala desiti u oogenezi. Pored toga, najučestaliji *de novo* događaj, kao što i navode literaturni podaci (White i Speiser., 2000), je genska konverzija kojom je mutacija c.290-13A/C>G preslikana u aktivni *CYP21A2* gen. Preostale dve *de novo* mutacije su mala genska konverzija Ex6-Ex8 kojom su zamenjeni šesti, sedmi i osmi egzon aktivnog gena homologom sekvencom pseudogena i himerni gen nastao nejednakim *crossing over*-om. Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* gen je detektovan u homozigotnom stanju, a njegovo odsustvo je potvrđeno kod majke. Mogući genetički mehanizam koji objašnjava prisustvo mutacije u homozigotnom stanju, kada je njeno odsustvo potvrđeno kod jednog od roditelja, je uniparentalna dizomija (Lopez-Gutierrez i sar., 1998). Pošto, međutim, analiza mikrosatelitskih markera nije vršena ova hipoteza nije mogla biti potvrđena. *De novo* mutacije u *CYP21A2* genu imaju važnu ulogu u uvođenju novih alela u populaciju i njihova učestalost obično iznosi 1-2% (Baumgartner-Parzer i sar., 2007). Iako u pojedinim slučajevima negativan rezultat testa očinstva može objasniti zašto otac nema mutaciju detektovanu kod deteta, a istraživanja ukazuju i da roditeljski haplotipovi sa deletiranim *CYP21A1P* pseudogenom (Sinnott i sar., 1990), kao i oni sa dupliciranim *CYP21A2* genom (Baumgartner-Parzer i sar., 2007) predstavljaju premutaciju i povećavaju podložnost nejednakom CO, neuobičajeno visok procenat *de novo* c.290-13A/C>G mutacija u našoj populaciji ostaje neobjašnjen. S obzirom da svi roditelji pacijenata nisu bili dostupni za analizu moguće je da sve *de novo* nastale mutacije nisu identifikovane.

Kompletnim sekvenciranjem egzonske i intronske sekvence *CYP21A2* gena detektovane su i brojne prijavljene varijante, posebno učestale u drugom intronu (tabela 5). Poznate nesinonimne aminokiselinske zamene p.K102R, p.S268T, p.S468G i p.N493S većina autora opisuje kao benigne varijante (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>). Međutim, ne treba zanemariti njihov potencijalni sinergistički efekat u istom haplotipu (Asanuma i sar., 1999), kao i činjenicu da, u slučaju nekih, uticaj na *in vitro* aktivnost enzima nikada nije analiziran (Dolžan i sar., 2005). Ovo saznanje mora biti od posebnog značaja prilikom analize pacijenata sa blagim simptomima i normalnim genotipom.

Širok spektar detektovanih mutacija u *CYP21A2* genu naglašava genetičku heterogenost populacije iz Srbije uzrokovanu brojnim migracijama preko balkanskog

poluostrva, a relativno male razlike u distribuciji *CYP21A2* mutacija primećenim između različitih analiziranih populacija mogu biti objašnjene visokim stepenom protoka gena između različitih etničkih grupa tokom vekova, kao i sličnim genetičkim mehanizmima odgovornim za prenos i ispoljavanje bolesti (Dolžan i sar., 2005).

5.2. KOMPLEKSNI ALELI SA VIŠE MUTACIJA

Još jedno interesantno otkriće studije molekularno-genetičke osnove KAH-a u Srbiji je visoka učestalost kompleksnih alela sa više mutacija (7,4%). Izuzev dva alela sa *de novo* mutacijama (c.[290-13A/C>G; 841G>T] i p.[I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W]), svi ostali aleli su potvrđeni i kod roditelja, sugerišući da su ovi haplotipovi prisutni u genofondu populacije iz Srbije. Kompleksan alel p.[I236N; V237E; M239K; V281L; L307fs; Q318X; R356W] označen i kao Ex6-Ex8 nosi sedam mutacija koje su u *CYP21A1P* pseudogenu prisutne kontinuirano u egzonomima šest, sedam i osam, što sugeriše da su najverovatnije zajedno procesom genske konverzije preslikane u aktivan gen. Postojanje alela c.[290-13A/C>G; 841G>T] je prethodno prijavljeno u Mađarskoj, Švedskoj, Argentini i SAD-u (Dolžan i sar., 2005; Wedell i sar., 1994; Marino i sar., 2011; Finkielstain i sar., 2011) sa približnom učestalošću od 1%, a alela c.[290-13A/C>G; 1357C>T] u Argentini i SAD-u (Dain i sar., 2002; Finkielstain i sar., 2011), ali su za ovaj alel zabeležene manje učestalosti (1,4% i 0,3%, kako sledi) od one detektovane kod pacijenata u Srbiji (3,7%). Na osnovu pretrage baza podataka i dostupne literature zaključeno je da alel c.[89C>T; 1357C>T] do sada nije prijavljen i da predstavlja novu kombinaciju poznatih mutacija specifičnih za pseudogen. Interesantno je da čak 75,0% detektovanih kompleksnih alela kod pacijenata u Srbiji nosi mutaciju p.P453S, retku sporadičnu mutaciju koja je kao pojedinačna mutacija detektovana na svega 1,9% alela. Ona je sa niskom učestalošću prijavljivana i u drugim populacijama. Važno je pritom napomenuti da je u određenom broju studija koje su se bavile genetičkom osnovom KAH-a u različitim populacijama vršena analiza isključivo najučestalijih mutacija (Wilson i sar., 2007; Anastasovska i sar., 2015), te niža učestalost prijavljenih kompleksnih alela u takvim studijama može biti pripisana i tzv. genotipiziranju niske rezolucije. Obzirom da nema dovoljno kompletnih podataka za poređenje nemoguće je zaključiti da li su navedeni kompleksni aleli uneti u populaciju iz Srbije ili je protok gena imao suprotan smer. Postojanje alela sa više mutacija kod pacijenata obolelih od KAH-a još

jednom naglašava važnost temeljne i precizne analize kompleksnog *CYP21A2* lokusa, kao i važnost uključivanja roditelja u cilju analize segregacije alela (Witchel i sar., 1996).

5.3. NOVE VARIJANTE p.L129P i p.S165P U KODIRAJUĆEM REGIONU GENA *CYP21A2*

Direktnim sekvenciranjem kompletne kodirajuće sekvence *CYP21A2* gena u analiziranoj grupi pacijenata su identifikovane i dve nove *missense* mutacije p.L129P (c.386T>C) i p.S165P (c.493T>C) (1,8%), obe u pojedinačnim porodicama. U cilju procene njihovog efekta na strukturu i funkciju *CYP21A2* proteina izvršena je *in silico* analiza. Radi verodostojnosti rezultata, kao što je preporučljivo, za analizu je korišćeno nekoliko različitih bioinformatičkih programa: PolyPhen-2, SIFT, MutPred, Clustal Omega, a izvršeno je i *in silico* modeliranje mutiranih *CYP21A2* proteina Swiss-Pdb Viewer programom. Kompjuterske predikcije su pokazale da su obe mutacije patogene, kao i da je efekat p.L129P na protein teži u poređenju sa efektom p.S165P mutacije. U slučaju mutacije p.L129P ne dolazi do promene u polarnosti zamenjene aminokiseline, dok mutacija p.S165P rezultuje zamenom polarne aminokiseline nepolarnom.

Poravnanje sekvenci *CYP21A2* proteina pet odabranih kičmenjačkih vrsta izvršeno uz pomoć Clustal Omega programa (slika 21) je pokazalo da se kod svih na poziciji 129 i 165 nalaze aminokiseline Lys i Ser, kako sledi, što je ukazalo na njihovu evolucionu očuvanost u steroid 21-hidroksilazi kod vrsta koje su na različitom stepenu filogenetske udaljenosti.

In silico modeliranje mutiranih *CYP21A2* proteina (slika 22) je ukazalo da iako je aminokiselinska zamena p.L129P očuvana u pogledu naelektrisanja i polarnosti, obzirom da je prolin rigidnija aminokiselina od leucina, predviđeno je da mutacija rezultuje nestabilnošću konformacije i sternim smetnjama. Sa druge strane, zamena serina prolinom u slučaju mutacije p.S165P dovodi do zamene polarne aminokiseline sa nepolarnom prolinskom reziduom, i pored sternih smetnji prolina sa susednim aminokiselinskim reziduama izaziva i disrupciju heliksa i destabilizaciju sekundarne strukture steroid 21-hidroksilaze.

Mutacija p.L129P je detektovana kod pacijenta sa teškom formom KAH-a sa gubitkom soli koji je na drugom homologom hromozomu nosio c.[290-13A/C>G; 1357C>T]. Efekat ovog kompleksnog alela sa dve mutacije određuje teža c.[290-13A/C>G] mutacija

koja dovodi do pogrešnog iskrajanja drugog introna. Kako je fenotip pacijenta težak može se zaključiti da je efekat nove p.L129P mutacije takođe težak obzirom da nije omogućio veću rezidualnu aktivnost enzima koja bi ublažila kliničku sliku. Pacijent sa novodetektovanom p.S165P mutacijom je složeni heterozigot koji je na drugom alelu nosio p.I172N mutaciju koja ostavlja do 5% rezidualne enzimatske aktivnosti i u korelaciji je sa klasičnom jednostavnom virilizujućom formom KAH-a. Kako pacijent ima dijagnozu neklasične forme bolesti može se pretpostaviti da je nova mutacija blaža i u korelaciji sa većom rezidualnom aktivnošću enzima.

Iako i bioinformatička predviđanja i klinički podaci ovih pacijenata konzistentno ukazuju da su i p.L129P i p.S165P patogene mutacije, dodatne ekspresione studije kao i funkcionalna karakterizacija rezidualne aktivnosti aberantnog enzima su neophodne u cilju definitivnog utvrđivanja njihovog patogenog efekta.

5.4. STOPA DETEKCIJE MUTACIJA

Nakon temeljne analize *CYP21A2* gena sekvenciranjem celog *CYP21A2* gena i analizom *CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena, patogene mutacije nisu detektovane kod sedam pacijenata, dok je kod osam pacijenata detektovana mutacija na samo jednom hromozomu. Ukupno je analizirano 122 hromozoma od kojih je 100 nosilo patogenu mutaciju dajući ukupnu stopu detekcije od 82,0%. Najviša stopa detekcije je zabeležena u grupi pacijenata sa klasičnom formom sa gubitkom soli (94,7%), niža u grupi pacijenata sa jednostavnom virilizujućom formom (83,3%), a приметно niža u grupi pacijenata sa neklasičnom formom KAH-a (72,2%).

Za odsustvo detekcije patogenih mutacija kod analiziranih pacijenata postoji više mogućih objašnjenja. Svakako najverovatnije objašnjenje je postojanje drugih tipova enzimatskih deficijencija koje rezultuju kliničkom slikom kongenitalne adrenalne hiperplazije, a nisu uzrokovane mutacijama u *CYP21A2* genu. Naime, mutacije u genima *CYP11B1*, *CYP17A1*, *HSD3B2* i *POR* uključenim u steroidogenezu u kori nadbubrežne žlezde su prema literaturnim podacima odgovorne za 5-10% slučajeva KAH-a (Krone i Arlt, 2009). Drugo moguće objašnjenje je postojanje mutacija u nekodirajućim regionima *CYP21A2* gena. Pojedina istraživanja su ukazala na potrebu za analizom regulatornih regiona *CYP21A2* gena i do pozicije -2000bp u svrhu detekcije mutacija u transkripcionim

regulatornim elementima (Wilson i sar., 1995). Pokazano je da promotorske mutacije poreklom iz pseudogena g.-126C>T, g.-113G>A i g.-103A>G redukuju transkripcionu aktivnost i do 20% (Bristow i sar., 1993; Chang i sar., 1995) i izazivaju neklasičnu formu KAH-a (Araujo i sar., 2007), dok je sa ovom formom bolesti u korelaciji i mutacija g.*13G>A u 3' UTR, prisutna sa učestalošću 1-4,7% u različitim populacijama (Menabò i sar., 2012). Mogućnost postojanja dubokih intronskih varijanti koje menjaju iskrajanje i tako utiču na aktivnost proteina takođe ne sme biti zanemarena. Kako kompletno sekvenciranje regulatornih regiona *CYP21A2* gena i analiza svih intronskih varijanti u ovoj studiji nisu izvršeni, može se pretpostaviti da je izvestan broj patogenih alela vrlo verovatno uzrokovan i ovim promenama. I na kraju, detekcija retkog haplotipa sa *TNXA/TNXB* himernim genom koji rezultuje kompletnom delecijom *CYP21A2* gena (slika 10B) i pratećim Ehler-Danlos sindromom nije vršena, što može objasniti odsustvo detekcije patogenih mutacija kod malog broja analiziranih hromozoma.

Važan faktor koji utiče na stopu detekcije mutacija jeste i odabir pacijenata za analizu. Vrednosti 17-OHP nakon stimulacije sa sintetičkim ACTH, koje se koriste za dijagnozu bolesti, pokazuju preklapanje između nosilaca i zdravih osoba, ali i između nosilaca i individua sa neklasičnom formom KAH-a (New i sar., 1983; Witchel i sar., 1998; Bachega i sar., 2002). Zabeležena stopa detekcije mutacija je najniža upravo u grupi pacijenata sa neklasičnom formom KAH-a (72,2%), sugerišući da su možda i heterozigotni nosioci uključeni u ovu grupu. Pored pomenutog biohemijskog preklapanja, primećeno je i fenotipsko preklapanje između heterozigota i individua sa neklasičnom formom KAH-a koje može biti još jedan razlog nemogućnosti njihovog razlikovanja. Naime, Admoni i sar. (2006) su pokazali ne samo da kod nosilaca postoji rizik za razvoj blagih kliničkih simptoma hiperandrogenizma, već i da je on u korelaciji sa genotipom. Tako nosioci blage p.V281L mutacije mogu pored povišene vrednosti 17-OHP razviti i sindrom policističnih jajnika (PCOS), hirzutizam i neredovne menstruacije, što je objašnjeno kompeticijom enzimskog produkta kodiranog ovim mutiranim genom sa *wild type* enzimom (Admoni i sar., 2006). U ovoj studiji od osam pacijenata sa jednom identifikovanom mutacijom u *CYP21A2* genu dva su imala p.V281L mutacije, te bi njihova klinička slika KAH-a mogla biti objašnjena i ovom hipotezom. Takođe, ispoljavanje kliničkih simptoma hiperandrogenizma ne mora biti obavezno uzrokovano mutacijama u *CYP21A2* genu, već i drugim genima i hormonima (Admoni i sar., 2006), te postojanje mogućnosti da su među pacijentima bez detektovanih mutacija i ovakvi pacijenti, ne može biti u potpunosti isključeno. U slučaju pedijatrijskih

pacijenata uzrok prevremena pubarhe, koja je u 80-95% slučajeva asocirana sa prevremenim nepatološkim lučenjem polnih hormona nadbubrežne žlezde, je u samo 5-20% slučajeva neklasična deficijencija 21-hidroksilaze (Armengaud i sar., 2009). Stoga ovaj, kao i drugi pojedinačni klinički simptomi, ne ukazuje pouzdano na neklasičnu formu KAH-a.

Postojanje biohemijskog i fenotipskog preklapanja između heterozigota i inividua sa blagom neklasičnom formom bolesti, široka diferencijalna dijagnoza u slučaju pacijenata sa kliničkim simptomima hiperandrogenizma, zatim moguća upotreba neadekvatno uspostavljenog praga detekcije bolesti na osnovu vrednosti 17-OHP (Bachega i sar., 2000) mogu objasniti nisku stopu detekcije mutacija u grupi sa NC formom KAH-a, kao i visoku zastupljenost ovih pacijenata u ukupnoj analiziranoj grupi pacijenata (44,3%).

Najviša stopa detekcije, sa druge strane, je zapažena u grupi pacijenata sa klasičnom formom KAH-a sa gubitkom soli (94,7%) što može biti objašnjeno teškim i jednoznačnim kliničkim simptomima koje izaziva ova varijanta bolesti.

5.5. KORELACIJA GENOTIP-FENOTIP

Na osnovu hormonskog profila i kliničkih simptoma određen je fenotip pacijenata. Od 61 pacijenta 19 (31,1%) je bolovalo od KAH-a sa gubitkom soli, 15 (24,6%) od jednostavne virilizujuće forme KAH-a i 27 (44,3%) od neklasične forme KAH-a. U cilju analize korelacije genotipa i kliničke slike pacijenti su na osnovu genotipa i predviđene rezidualne aktivnosti CYP21A2 proteina klasifikovani u pet mutacionih grupa, pri čemu su složeni heterozigoti klasifikovani na osnovu patogenog alela koji dozvoljava veću rezidualnu aktivnost.

Iako je uopšteno stepen konkordantnosti između genotipa i fenotipa bio visok, u većini mutacionih grupa je primećena i izvesna fenotipska varijabilnost (tabela 8). Izuzev mutacione grupe „B” u kojoj je mutacija p.I172N očekivano bila u korelaciji samo sa jednostavnim virilizujućom formom, u svim ostalim mutacionim grupama su identifikovani i pacijenti sa fenotipom težim ili blažim od predviđenog. Osim jednog pacijenta sa neklasičnom formom bolesti i genotipom p.[Q318X];[L307fs], svi pacijenti u „null” mutacionoj grupi su očekivano bolovali od teške forme KAH-a sa gubitkom soli. Odstupanje kod pomenutog pacijenta može jednostavno biti objašnjeno postojanjem haplotipa sa dva

duplicirana *CYP21A2* gena, od kojih je samo jedan nosilac p.Q318X mutacije. Haplotipovi sa p.Q318X mutacijom i dupliciranim *CYP21A2* genima su prisutni sa različitom učestalošću u različitim populacijama (Kleinle i sar., 2009), te ih je neophodno uzeti u razmatranje uvek kada postoji neslaganje kliničkih i hormonskih podataka sa genotipom koji uključuje navedenu mutaciju. Preostali pacijenti sa p.Q318X mutacijom su ispoljili očekivani fenotip, na osnovu čega se može zaključiti da ovaj haplotip nije učestao u populaciji iz Srbije. Razlikovanje teške tačkaste mutacije na hromozomu sa samo jednim *CYP21A2* genom od varijante koja ne rezultuje deficijencijom, a podrazumeva dupliciran *CYP21A2* gen, je od posebne važnosti za genetičko savetovanje i prenatalnu dijagnostiku (Lekarev i sar., 2013).

Velika fenotipska varijabilnost je zapažena u „A” mutacionoj grupi gde je od ukupno 13 pacijenata devet imalo formu sa gubitkom soli, tri jednostavnu virilizujuću formu, dok je jedan pacijent bolovao od neklasične forme KAH-a. Iako je u većini slučajeva c.290-13A/C>G mutacija u korelaciji sa KAH-om sa gubitkom soli, poznato je da neki pacijenti ispolje i druge dve forme bolesti. Povremena korelacija *splice* c.290-13A/C>G mutacije sa blažim formama bolesti može biti uslovljena ispravnim iskrajanjem određenog broja transkripata, te većom enzimatskom aktivnošću i umanjenom težinom fenotipa (New i sar., 2013).

U mutacionoj grupi „C”, kojoj pripadaju mutacije koje dovode do smanjenja enzimatske aktivnosti na 20-60% i neklasične forme KAH-a, takođe je primećena varijabilna klinička ekspresija bolesti. Od jedanaest nosilaca p.P30L mutacije devet je bolovalo od neklasične forme KAH-a, a dva pacijenta su imala dijagnozu teže klasične jednostavne virilizujuće forme. Ovi podaci su u skladu sa rezultatima analize genotip-fenotip korelacije dosad najvećeg broja pacijenata (New i sar., 2013), dok su i u mnogim drugim studijama prijavljeni nosioci p.P30L sa fenotipom težim od očekivanog (Dracopoulou i sar., 2001; Balsamo i sar., 2000; Krone i sar., 2000; Dolžan i sar., 2005). Iznenađujuće, oba pacijenta sa p.P453S mutacijom su ispoljila fenotip teži od očekivanog. Izuzev jednog pacijenta kod kojeg je mutacija p.P30L detektovana u homozigotnom obliku, kod svih drugih pacijenata „C” grupe kod kojih se javilo odstupanje između genotipa i fenotipa, na drugom hromozomu sa patogenom mutacijom detektovana je teška mutacija „null” ili „A” grupe. Ovde možemo spekulirati da je kod nekih pacijenata nivo aktivnosti enzima *in vivo* između nivoa enzimatskih aktivnosti prisutnih kod pacijenata koji su homozigoti za svaku mutaciju ponaosob. Bachega i sar. (2000) su pokazali da kod pacijenata sa mutacijama koje određuju

neklasičnu formu bolesti težina mutacije na drugom homologom hromozomu utiče na 17-OHP vrednost, kao i na fenotip.

U „D” mutacionu grupu su svrstani pacijenti sa genotipovima na osnovu kojih nije bilo moguće predvideti fenotip. Tu spadaju pacijenti sa novim mutacijama nepoznate *in vitro* aktivnosti enzima, pacijenti sa samo jednom detektovanom mutacijom i pacijenti kod kojih je detektovan himerni gen sa tačkom prekida do trećeg egzona (CH-Ex3). Himerni CH-Ex3 aleli mogu imati varijabilan efekat na enzim steroid 21-hidroksilazu u zavisnosti da li nose samo p.P30L mutaciju ili i tešku c.290-13A/C>G mutaciju (Chen i sar., 2012). Kako precizne tačke prekida nisu određene, fenotip takvih alela je bilo nemoguće pouzdano predvideti.

Kod većine pacijenata sa deficiencijom 21-hidroksilaze (74,0%) uočena je dobra korelacija između genotipa i fenotipa. Genotip je dobro predvideo fenotip kod četiri od pet pacijenata u grupi „null” (80,0%), kod devet od 13 pacijenata u „A” grupi (69,2%), kod oba pacijenta u „B” grupi (100,0%) i kod 11 od 15 pacijenata „C” grupe (73,3%).

U analiziranoj grupi pacijenata iz Srbije veća varijabilnost kliničkih fenotipova je primećena u „A” i „C” grupama odnosno kod pacijenata čiju kliničku sliku određuju c.290-13A/C>G i p.P30L mutacije, što je u skladu sa rezultatima studije koju su publikovali New i sar. (2013). Nasuprot tome, primećeno je i odsustvo očekivane fenotipske varijabilnosti u „B” mutacionoj grupi (genotipovi sa p.I172N mutacijom), najverovatnije zbog malog broja pacijenata (n=2), kao i prisustvo težih fenotipova kod nosilaca p.P453S mutacije. Na osnovu svega navedenog možemo zaključiti da u grupi analiziranih pacijenata iz Srbije teške mutacije, koje dovode do potpunog odsustva enzimske aktivnosti, jednoznačno rezultuju najtežim fenotipom KAH-a, dok kod pacijenata sa mutacijama koje rezultuju parcijalnom aktivnošću enzima predviđanje fenotipa nije toliko pouzdano.

Divergencija u fenotipovima je primećena u studijama širom sveta (Krone i sar., 2000). Slučaj spontanog parcijalnog oporavka od KAH-a (Speiser i sar., 1991), kao i fenotipska varijabilnost prisutna kod braće/sestara sa istim genotipom (Chin i sar., 1998), ukazuju na uticaj gena modifikatora, kao i transkripcionih regulatora na fenotip KAH-a, što je karakteristika brojnih monogenskih oboljenja (Dipple i McCabe, 2000; Scriver i Waters, 1999).

Na samom kraju, objašnjenje za nedostatak genotip-fenotip korelacije može biti nađeno i u korišćenoj metodologiji (New i sar., 2013), odnosno njenim ograničenjima.

Mutacije u regulatornim regionima *CYP21A2* gena, retki *TNXA/TNXB* himerni aleli (L'Allemand i sar., 2000), kao i duplicirani *CYP21A2* geni koje uvedena metodologija ne detektuje, mogli bi u pojedinim slučajevima da objasne primećeno odstupanje od očekivanog fenotipa. New i sar. (2013) su sugerisali da bi kod takvih pacijenata sekvenciranje celog egzoma bilo veoma korisno.

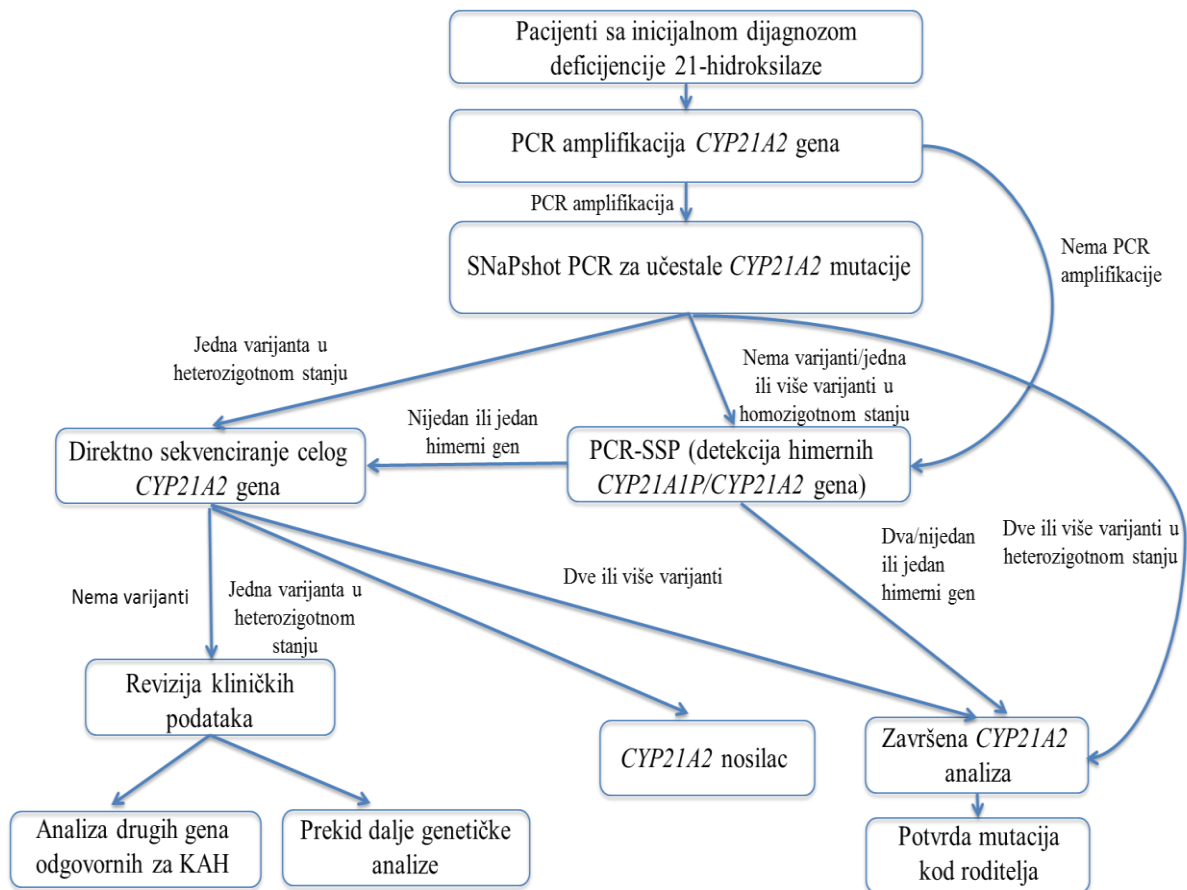
Podaci dobijeni u studijama genotip-fenotip korelacije su od posebnog značaja za genetičko savetovanje roditelja koji imaju rizik za dobijanje obolelog potomstva, kao i za prenatalnu dijagnostiku (New i sar., 2013). DNK fetusa dobijena biopsijom horionskih resica ili izolovana iz krvi majke se koristi za određivanje genotipa na osnovu kojeg se vrši predviđanje fetalnog fenotipa. Time je, ukoliko je potrebna, omogućena primena prenatalne terapije obolelih ženskih fetusa. Iako ovo predviđanje nije u potpunosti precizno, i treba ga vršiti sa velikim oprezom, određivanje dominantnog fenotipa koji je u korelaciji sa određenim genotipom je uvek korisno.

5.6. ALGORITAM ZA OPTIMALNU MOLEKULARNU DIJAGNOSTIKU KAH-A U SRBIJI

KAH izazvan deficijencijom 21-hidroksilaze je jedan od najučestalijih autozomno recesivnih poremećaja, ali je njegova genetička dijagnoza među najkomplikovanijim kada su u pitanju monogenske bolesti. Velika varijabilnost *CYP21A2* genskog lokusa rezultuje kompleksnim genetičkim varijacijama i neuobičajenim haplotipovima koji za posledicu mogu imati pogrešno određivanje genotipa pacijenta, kao i statusa nosioca. Takođe, dokumentovane su populaciono specifične razlike u pogledu spektra i učestalosti detektovanih mutacija (Dolžan i sar., 2005; Wilson i sar., 2007), zbog čega je karakterizacija *CYP21A2* gena neophodan korak u razvoju adekvatne strategije za dijagnostiku ovog oboljenja u našoj zemlji.

Na osnovu celokupnog spektra i učestalosti detektovanih mutacija u analiziranoj grupi pacijenata u ovoj studiji je predložen optimalan molekularno-genetički algoritam za dijagnostiku KAH-a u Srbiji (slika 23). Ova strategija kombinuje prethodno razvijenu SNaPshot PCR metodu za brzu detekciju deset učestalih *CYP21A2* mutacija (c.290-13A/C>G, p.P30L, p.R356W, p.G110fs, p.V281L, p.Q318X, p.L307fs, p.I172N, p.P453S i p.[I236N; V237E; M239K]) (Ugrin, 2017; Krone i sar., 2002), zatim PCR-SSP metodu za

detekciju velikih genomskih rearanžmana (*CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena) i direktno DNK sekvenciranje za detekciju retkih i novih varijanti koje su razvijene u okviru ove doktorske teze.



Slika 23. Dijagnostički algoritam za molekularno-genetičku dijagnozu kongenitalne adrenalne hiperplazije u Srbiji.

Inicijalni korak predloženog algoritma podrazumeva selektivnu amplifikaciju celog *CYP21A2* gena. Rekurentno odsustvo amplifikacije aktivnog gena, često u korelaciji sa najtežom formom bolesti, predstavlja indicaciju za analizu velikih genomskih rearanžmana (*CYP21A1P/CYP21A2* himernih gena). Himerni *CYP21A1P/CYP21A2* geni nasleđeni na oba hromozoma mogu biti potencijalni uzrok nemogućnosti dobijanja PCR produkta. Ukoliko je do amplifikacije došlo sledi detekcija deset učestalih mutacija SNaPshot PCR metodom. Na

ovaj način se vrši brzi skrining na većinu mutacija (preko 80%) koje uzrokuju KAH u populaciji iz Srbije. Ukoliko mutacije nisu detektovane ili su detektovane u homozigotnom stanju takođe je neophodno izvršiti i analizu himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena PCR-SSP metodom. Naime, zbog pojave „allele dropout” postojanje jedinstvenog mutantnog pika ne znači obavezno i prisustvo mutacije u homozigotnom stanju, već se uvek u obzir mora uzeti i potencijalni nedostatak jednog alela, na šta može ukazati i potpuno odsustvo varijanti, posebno brojnih u drugom intronu. Ukoliko himerni geni nisu detektovani dobijena je potvrda da su oba alela amplifikovana i da je ista mutacija nasleđena od oba roditelja. Detekcija samo jedne mutacije u heterozigotnom stanju zahteva dalju analizu gena direktnim DNK sekvenciranjem u cilju identifikacije retkih ili novih varijanti. Nakon završene analize *CYP21A2* gena kod pacijenata kod kojih su detektovane jedna, dve i više mutacija vrši se analiza roditeljskih gena za finalnu molekularno-genetičku dijagnozu. Kod pacijenata kod kojih, međutim, nije detektovana nijedna mutacija, indikovana je revizija kliničkih podataka.

Značaj genotipiziranja kao nezavisne komplementarne metode za finalnu potvrdu kliničke i biohemijske dijagnoze KAH-a je veliki. Zbog postojanja biohemijskog i fenotipskog preklapanja između zdravih individua, heterozigotnih nosilaca i pacijenata sa neklasičnom formom bolesti, uvek je preporučljiva naknadna genetička analiza *CYP21A2* gena. Takođe, detekcija mutacija u *CYP21A2* genu je važna i za identifikaciju nosilaca i asimptomatskih pacijenata, a neophodna je i za genetičko savetovanje i prenatalnu dijagnozu.

Molekularno-genetička dijagnostika će svoju primenu imati i po uvođenju neonatalnog skrininga na KAH kod novorođenčadi. Iako je korist ovakovog skrining programa dokumentovana širom sveta, stopa lažno pozitivnih rezultata izazvana neonatalnim stresom i nezrelom adrenalnom funkcijom kod prevremeno rođenih i bolesnih beba predstavlja veliki problem koji može biti rešen uvođenjem molekularne karakterizacije *CYP21A2* gena u rutinsku kliničku praksu.

Ova studija predstavlja prvu sveobuhvatnu analizu spektra i učestalosti *CYP21A2* mutacija kod pacijenata obolelih od KAH-a u našoj zemlji i daje značajan doprinos molekularno-genetičkoj dijagnostici ovog oboljenja ne samo u Srbiji, već i širom Evrope.

6. ZAKLJUČCI

1. Prvi put u Srbiji uvedena je sveobuhvatna metodologija za analizu molekularno-genetičke osnove KAH-a uzrokovanog deficijencijom steroid 21-hidroksilaze. Optimizovane su PCR-SSP i metoda direktnog DNK sekvenciranja *CYP21A2* gena, čime je omogućena detekcija himernih *CYP21A1P/CYP21A2* gena nastalih nejednakom razmenom delova homologih sekvenci, mutacija nastalih genskom konverzijom, ali i retkih i novih genetičkih varijanti.
2. Izvršena je kompletna molekularno-genetička identifikacija mutacija u *CYP21A2* genu, pri čemu je detektovano 18 patogenih alela koji su doveli do ispoljavanja bolesti i postignuta je ukupna stopa detekcije od 82,0%. Stopa detekcije je bila najviša (94,7%) u grupi pacijenata sa teškom formom KAH-a sa gubitkom soli.
3. Utvrđena je učestalost *CYP21A2* mutacija u populaciji iz Srbije, pri čemu je, kao i u većini drugih populacija, najčešće detektovana mutacija c.290-13A/C>G sa relativnom učestalošću od 18,5%.
4. Pet učestalih alela koji uključuju c.290-13A/C>G, *CYP21A1P/CYP21A2*, p.P30L, p.R356W i p.G110fs mutacije, čine 63,0% svih mutiranih *CYP21A2* alela kod analiziranih pacijenata iz Srbije.
5. Primećena je populaciono specifična veća učestalost *missense* mutacije p.R356W (11,1%), detektovana u sličnom procentu još samo u Hrvatskoj i Turskoj u okviru balkanskog regiona. Detektovana je i visoka učestalost kompleksnih alela sa višestrukim mutacijama (7,4%), među kojima čak 75,0% sadrži p.P453S mutaciju, u drugim populacijama retku mutaciju.
6. Molekularno-genetička analiza *CYP21A2* gena kod pacijenata obolelih od KAH-a u Srbiji je dovela i do otkrića dve nove *missense* mutacije p.L129P (c.386T>C) i p.S165P (c.493T>C). Kompjuterske analize novootkrivenih aminokiselinskih zamena su predvidele štetan efekat na protein što je u skladu sa fenotipskim efektom zapaženim kod pacijenata.
7. Kod većine pacijenata (74,0%) uočena je dobra korelacija između genotipa *CYP21A2* gena i fenotipa KAH-a, ali je primećeno da su mutacije c.290-13A/C>G i p.P30L i kod pacijenata iz Srbije u korelaciji sa varijabilnom ekspresijom bolesti, dok mutacija p.P453S neočekivano dovodi do razvoja klasične forme KAH-a.
8. Na osnovu spektra i učestalosti *CYP21A2* mutacija kod analiziranih pacijenata predložen je optimalan algoritam za molekularno-genetičku dijagnostiku KAH-a u

Srbiji. Ova strategija kombinuje SNaPshot PCR za brzu detekciju deset učestalih *CYP21A2* mutacija, PCR-SSP metodu za detekciju velikih genomskih rearanžmana (*CYP21A1P/CYP21A2* gena) i direktno sekvenciranje za detekciju retkih i novih varijanti. Time je omogućena pre- i postnatalna molekularno-genetička potvrda kliničke i biohemijske dijagnoze, identifikacija nosilaca i asimptomatskih pacijenata u Srbiji.

7. LITERATURA

Admoni O, Israel S, Lavi I, Gur M, Tenenbaum-Rakover Y. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol*. 2006; 64: 645–651.

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: 4562-7.

Anastasovska V, Milenković T, Kocova M. Direct Molecular Diagnosis of CYP21A2 Point Mutations in Macedonian and Serbian Patients with 21-Hydroxylase Deficiency. *J Med Biochem*. 2015; 34: 52-57.

Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, Lin CJ, Marcondes JA, Billerbeck AE, Bachega TA. Microconversion between CYP21A2 and CYP21A1P promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 4028–34.

Armengaud JB, Charkaluk ML, Trivin C, Tardy V, Bréart G, Brauner R, Chalumeau M. Precocious pubarche: distinguishing late-onset congenital adrenal hyperplasia from premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 2835-40.

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISSMODELworkspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*. 2006; 22: 195–201.

Asanuma A, Ohura T, Ogawa E, Sato S, Igarashi Y, Matsubara Y, Inuma K. Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Jour Hum Genet*. 1999; 44: 312–317.

Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ and Mendonca BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 52: 601–607.

Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB. Variable ACTH-stimulated 17-hydroxyprogesterone values in 21-hydroxylase deficiency carriers are not related to the different CYP21 gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 786-90.

Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, Tartaglia L, Cassio A, Mantovani V, Piazzini S, Cicognani A, Pirazzoli P, Mainetti B, Zappulla F. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000; 53: 117–125.

Baş F, Kayserili H, Darendeliler F, Uyguner O, Günöz H, Yüksel Apak M, Atalar F, Bundak R, Wilson RC, New MI, Wollnik B, Saka N. CYP21A2 gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: genotype-phenotype correlation in Turkish children. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2009; 1: 116–128.

Baumgartner-Parzer SM, Fischer G, Vierhapper H. Predisposition for de novo gene aberrations in the offspring of mothers with a duplicated CYP21A2 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 1164-7.

Beyenburg S, Watzka M, Clusmann H, Blümcke I, Bidlingmaier G, Elger CE, Stoffel-Wagner B. Messenger RNA of steroid 21-hydroxylase (CYP21) is expressed in the human hippocampus. *Neurosci Lett*. 2001; 308: 111–114.

Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, Chung EK, Jones KN, Sotos JF, Zipf WB, Rennebohm RM, Yung Yu C. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of RP-C4-CYP21-TNX (RCCX) modules in caucasians. The load of RCCX genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease. *J Exp Med*. 2000; 191: 2183-96.

Bormann M, Kochhan L, Knorr D, Bidlingmaier F, Olek K. Clinical heterogeneity of 21-hydroxylase deficiency of sibs with identical 21-hydroxylase genes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1992; 126: 7-9.

Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, Staels B, Miller WL. Abundant adrenalspecific transcription of the human P450c21A „pseudogene”. *J Biol Chem*. 1993; 268: 12919–12924.

Campos VC, Pereira RMC, Torres N, Castro M, Aguiar-Oliveira MH. High frequency of Q318X mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in northeast Brazil. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009; 53: 40-6.

Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, Ferrari M. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 1996; 98: 662–665.

Carroll MC, Campbell RD, Porter RR. Mapping of steroid 21-hydroxylase genes adjacent to complement component C4 genes in HLA, the major histocompatibility complex in man. *Proc Nat Acad Sci*. 1985; 82: 521-525.

Chang SF, Chung BC. Difference in transcriptional activity of two homologous CYP21A genes. *Mol Endocrinol*. 1995; 9: 1330–1336.

Chemaitilly W, Betensky BP, Marshall I, Wei JQ, Wilson RC, New MI. The natural history and genotype-phenotype nonconcordance of HLA identical siblings with the same mutations of the 21-hydroxylase gene. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005; 18: 143-53.

Chen W, Xu Z, Sullivan A, Finkelstein GP, Van Ryzin C, Merke DP, McDonnell NB. Junction site analysis of chimeric CYP21A1P/CYP21A2 genes in 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem*. 2012; 58: 421–430.

Chin D, Speiser PW, Imperato-McGinley J, Dixit N, Uli N, David R, Oberfield SE. Study of a kindred with classic congenital adrenal hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83: 1940-5.

Chung EK, Yang Y, Rennebohm RM, Lokki M-L, Higgins GC, Jones KN, Zhou B, Blanchong CA, Yu CY. Genetic sophistication of human complement components *C4A* and *C4B* and *RP-C4-CYP21-TNX* (RCCX) modules in the major histocompatibility complex. *Am J Hum Genet*. 2002; 71: 823-837.

Concolino P, Mello E, Zuppi C, Capoluongo E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: An update of new CYP21A2 mutations. *Clin Chem Lab Med*. 2010; 48: 1057–62.

Dain LB, Buzzalino ND, Oneto A, Belli S, Stivel M, Pasqualini T, Minutolo C, Charreau EH, Alba LG. Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients. *Clin Endocrinol*. 2002; 56: 239–245.

Dangel AW, Mendoza AR, Baker BJ, Daniel CM, Carroll MC, Wu LC, Yu CY. The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates. *Immunogenetics*. 1994; 40: 425–36.

Day DJ, Speiser PW, White PC, Barany F. Detection of steroid 21-hydroxylase alleles using gene-specific PCR and a multiplexed ligation detection reaction. *Genomics* 1995; 29:152-162.

Day DJ, Speiser PW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F, White PC. Identification of non-amplifying *CYP21* genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet.* 1996; 5: 2039-2048.

De Raeve L, De Schepper J, Smitz J. Prepubertal acnae: a cutaneous marker of androgen excess? *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 181-184.

Dipple KM, McCabe ER. Phenotypes of patients with „simple” Mendelian disorders are complex traits: thresholds, modifiers, and systems dynamics. *Am J Hum Genet.* 2000; 66: 1729–1735.

Dolžan V, Stopar-Obreza M, Žerjav-Tanšek M, Breskvar K, Kržišnik C, Battelino T. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala-15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149: 137–144.

Dolžan V, Sólyom J, Fekete G, Kovács J, Rakosnikova V, Votava F, Lebl J, Pribilincova Z, Baumgartner-Parzer SM, Riedl S, Waldhauser F, Frisch H, Stopar-Obreza M, Kržišnik C, Battelino T. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153: 99–106.

Donohoue PA, Van Dop C, McLean RH, White PC, Jospe N, Migeon CJ. Gene conversion in salt-losing congenital adrenal hyperplasia with absent complement C4B protein. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986; 62: 995-1002.

Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. The spectrum of molecular defects of the *CYP21* gene in the Hellenic population: variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2845–2848.

Dumic KK, Grubic Z, Yuen T, Wilson RC, Kusec V, Barisic I, Stingl K, Sansovic I, Skrabic V, Dumic M, New MI. Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members

with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017; 165: 51-56.

Escobar-Morreale HF, San Millan JL, Smith RR, Sancho J, Witchel SF. The presence of the 21-hydroxylase deficiency carrier status in hirsute women: phenotype-genotype correlations. *Fertil Steril.* 1999; 72: 629-638.

Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet.* 1995; 96: 198–204.

Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, McDonnell NB, Merke DP. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: E161–E172.

Funder JW. Aldosterone action. *Annu Rev Physiol.* 1993; 55: 115-30.

Ghizzoni L, Cappa M, Vottero A, Ubertini G, Carta D, Di Iorgi N, Gasco V, Marchesi M, Raggi V, Ibba A, Napoli F, Massimi A, Maghnie M, Loche S, Porzio O. Relationship of CYP21A2 genotype and serum 17-hydroxyprogesterone and cortisol levels in a large cohort of Italian children with premature pubarche. *Eur J Endocrinol.* 2011; 165: 307- 314.

Goncalves J, Friaes A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency. *Expert Rev Mol Med.* 2007; 9: 1–23.

Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, Yuen T, Zaidi M, New MI. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110: 2605–10.

Han TS, Walker BR, Arlt W, Ross RJ. Treatment and health outcomes in adults with congenital adrenal hyperplasia. *Nat Rev Endocrinol.* 2014; 10: 115–124.

Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 2841-5.

Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 7486-7490.

Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, Ohura T, Ogawa E, Nakayama K, Fujii-Kuriyama Y. Effects of individual mutations in the P-450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and their distribution in the patient genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biochem (Tokyo)*. 1991; 109: 638–644.

Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ. Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocrine Journal*. 1998; 45: 13-33.

Jääskeläinen J, Levo A, Voutilainen R, Partanen J. Population-wide evaluation of disease manifestation in relation to molecular genotype in steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency: good correlation in a well defined population. *J Clin Endocr Metab*. 1997; 82: 3293-3297.

Jääskeläinen J, Voutilainen R. Long-term outcome of classical 21-hydroxylase deficiency: diagnosis, complications and quality of life. *Acta Paediatr*. 2000; 89: 183–187.

Kayes-Wandover KM, White PC. Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000; 85: 2519–2525.

Kharrat M, Tardy V, M'Rad R, Maazoul F, Jemaa LB, Refaï M, Morel Y, Chaabouni H. Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 368-74.

Kleinle S, Lang R, Fischer GF, Vierhapper H, Waldhauser F, Födinger M, Baumgartner-Parzer SM. Duplications of the functional CYP21A2 gene are primarily restricted to Q318X alleles: Evidence for a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94: 3954–3958.

Kominami S, Owaki A, Iwanaga T, Tagashira-Ikushori H, Takeshi Y. The Rate-determining step in P450 C21-catalyzing Reactions in a Membrane-reconstituted System. *J Biol Chem*. 2001; 276: 10753-10758.

Koppens PF, Hoogenboezem T, Degenhart HJ. Duplication of the CYP21A2 gene complicates mutation analysis of steroid 21-hydroxylase deficiency: characteristics of three unusual haplotypes. *Hum Genet*. 2002; 111: 405–10.

Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 1059–1065.

Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch CJ, Sippell WG. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem.* 2002; 48: 818–825.

Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23: 181–192.

Lako M, Ramsden S, Campbell RD, Strachan T. Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis. *J. Med. Genet.* 1999; 36: 119-124.

Lee HH, Kuo JM, Chao HT, Lee YJ, Chang JG, Tsai CH, Chung BC. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85: 597-600.

Lekarev O, Tafuri K, Lane AH, Zhu G, Nakamoto JM, Buller-Burckle AM, Wilson TA, New MI. Erroneous prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to a duplication of the CYP21A2 gene. *J Perinatol.* 2013; 33: 76–78.

Levine LS, Dupont B, Lorenzen F, Pang S, Pollack M, Oberfield SE, Kohn B, Lerner A, Cacciari E, Mantero F, Cassio A, Scaroni C, Chiumello G, Rondanini GF, Gargantini L, Giovannelli G, Viridis R, Bartolotta E, Migliori C, Pintor C, Tato L, Barboni F, New MI. Genetic and hormonal characterization of cryptic 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981; 53: 1193-8.

Lopez-Gutierrez AU, Riba L, Ordonez-Sanchez ML, Ramirez-Jimenez S, Cerillo-Hinojosa M, Tusié-Luna MT. Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms. *J Med Genet.* 1998; 35: 1014-1019.

Loeber JG. Neonatal screening in Europe; the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30: 430–8.

Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

- Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, Ciaccio M, Warman DM, Guercio G, Chaler E, Maceiras M, Bergadá I, Gryngarten M, Balbi V, Pardes E, Rivarola MA, Belgorosky A. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol*. 2011; 75: 427–35.
- Marumudi E, Sharma A, Kulshreshtha B, Khadgawat R, Khurana ML, Ammini AC. Molecular genetic analysis of *CYP21A2* gene in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012; 16: 384–388.
- Menabò S, Balsamo A, Baldazzi L, Barbaro M, Nicoletti A, Conti V, Pirazzoli P, Wedell A, Cicognani A. A sequence variation in 3'UTR of *CYP21A2* gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest*. 2012; 35: 298–305.
- Merke DP, Chrousos GP, Eisenhofer G, Weise M, Keil MF, Rogol AD, Van Wyk JJ., Bornstein SR. Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency. *New Eng J Med*. 2000; 343: 1362-1368.
- Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005; 365: 2125 – 2136.
- Merke DP, Chen W, Morissette R, Xu Z, Van Ryzin C, Sachdev V, Hannoush H, Shanbhag SM, Acevedo AT, Nishitani M, Arai AE, McDonnell NB. Tenascin-X haploinsufficiency associated with Ehlers-Danlos syndrome in patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98: E379-87.
- Mikami A, Fukushi M, Oda H, Fujita K, Fujieda K. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Sapporo City: sixteen years experience. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30: 100-2.
- Milačić I, Barać M, Milenković T, Ugrin M, Klaassen K, Skakić A, Ješić M, Joksić I, Mitrović K, Todorović S, Vujović S, Pavlović S, Stojiljković M. Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro *CYP21A2* gene mutations. *J Endocrinol Invest*. 2015; 38: 1199-210.
- Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. *Endocr Rev*. 2011; 32: 81-151.

New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, Dupont B, Stoner E, Levy DJ, Panq S, Levine LS. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: Hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983; 57: 320-326.

New MI, Wilson RC. Steroid disorders in children: congenital adrenal hyperplasia and apparent mineralocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96: 12790–7.

New MI. Nonclassical 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 4205-4214.

New MI. Ancient history of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev.* 2011; 20: 202-11.

New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T. Genotype-phenotype correlation in 1507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 2611–2616.

^aNew MI, Lekarev O, Mancenido D, Parsa A, Yuen T. Congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. In: New MI, Lekarev O, Parsa A, O'Malley B, Hammer GD, editors. *Genetic steroid disorders.* Elsevier, London, UK; 2014: 29–51.

^bNew MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KCA, Khattab A, Liao GJ, Yau M, Kim SM, Chiu RW, Sun L, Zaidi M, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99: 1022–30.

Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2009; 38: 699–718.

Nordenström A, Butwicka A, Hirschberg AL, Almqvist C, Nordenskjöld A, Falhammar H, Frisén L. Are carriers of *CYP21A2* mutations less vulnerable to psychological stress? A population-based national cohort study. *Clin endocrinol.* 2017; 86: 317–324.

Ohlsson G, Müller J, Skakkebaek NE, Schwartz M. Steroid 21-hydroxylase deficiency: mutational spectrum in Denmark, three novel mutations, and in vitro expression analysis. *Hum Mutat.* 1999; 13: 482-6.

Ojeifo JO, Winters SJ, Troen P. Basal and adrenocorticotrophic hormone-stimulated serum 17 α -hydroxyprogesterone in men with idiopathic infertility. *Fertil Steril.* 1984; 42: 97–101.

Padilla C. Newborn screening in the Philippines. *Southeast Asia J Trop Med Pub Health*. 2003; 34: 87-88.

^aPallan PS, Wang C, Lei L, Yoshimoto FK, Auchus RJ, Waterman MR, Guengerich FP, Egli M. Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: STRUCTURE OF THE ENZYME·PROGESTERONE SUBSTRATE COMPLEX AND RATE-LIMITING C-H BOND CLEAVAGE. *J Biol Chem*. 2015; 22; 290: 13128-43.

^bPallan PS, Lei L, Wang C, Waterman MR, Guengerich FP, Egli M. Research resource: Correlating Human Cytochrome P450 21A2 Crystal Structure and Phenotypes of Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Mol Endocrinol*. 2015; 29: 1357-1384.

Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, Surve AS, New MI. A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982; 55: 413–20.

Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics*. 1988; 81: 866–74.

Pang S, Clark A. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: Newborn screening and its relationship to the diagnosis and treatment of the disorder. *Screening*. 1993; 2: 105–139.

Peter M, Sippell WG, Lorenzen F, Westphal E, Willig RP, Grosse-Wilde H. Improved test to identify heterozygotes for congenital adrenal hyperplasia without index case examination. *Lancet*. 1990; 335 : 1296-1299.

Pinto G, Tardy V, Trivin C, Thalassinos C, Lortat-Jacob S, Nihoul-Fékété C, Morel Y, Brauner R. Follow-Up of 68 Children with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency: Relevance of Genotype for Management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88: 2624-2633.

Prader A. Der genitalbefund beim pseudohermaphroditismus femininus des kongenitalen adrenogenitalen syndroms. *Helv Pediatr Acta* 9: 231-248.

Riepe FG, Sippell WG. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007; 8: 349.

Robins T, Carlsson J, Sunnerhagen M, Wedell A, Persson B. Molecular model of human CYP21 based on mammalian CYP2C5: structural features correlate with clinical severity of mutations causing congenital adrenal hyperplasia. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 2946–2964.

Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD. Molecular characterization of the HLA-lined steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J.* 1987; 6: 1653–1661.

Rocha RO, Billerbeck AE, Pinto EM, Melo KF, Lin CJ, Longui CA, Mendonca BB, Bachega TA. 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. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008; 68: 226-32.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977; 74: 5463-67.

Schalkwijk J, Zweers MC, Steijlen PM, Dean WB, Taylor G, van Vlijmen IM, van Haren B, Miller WL, Bristow J. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1167–75.

Scriber CR, Waters PJ. Monogenic traits are not simple: lessons from phenylketonuria. *Trends Genet.* 1999; 15: 267–272.

Sevrioukova IF, Peterson JA. NADPH-P-450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. *Biochimie.* 1995; 77: 562-572.

Schulze E, Scharer G, Rogatzki A, Priebe L, Lewicka S, Bettendorf M, Hoepffner W, Heinrich UE, Schwabe U. Divergence between genotype and phenotype in relatives of patients with the intron 2 mutation of steroid-21-hydroxylase. *Endocr Res.* 1995; 21: 359-64.

Sido AG, Weber MM, Sido PG, Clausmeyer S, Heinrich U, Schulze E. 21-Hydroxylase and 11 β -Hydroxylase Mutations in Romanian Patients with Classic Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 5769-5773.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 2011; 7: 539.

Sinnott P, Collier S, Costigan C, Dyer PA, Harris R, Strachan T. Genesis by meiotic unequal crossover of a de novo deletion that contributes to a steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Nat Acad Sci*. 1990; 87: 2107-2111.

Slominski A, Ermak G, Mihm M. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17, and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81: 2746–2749.

Speiser PW, Dupont B, Rubinstein P, Piazza A, Kastelan A, New MI. High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985; 37: 650–667.

Speiser PW, New MI, White PC. Molecular genetic analysis of nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency associated with HLA-B14, DR1. *N Engl J Med*. 1988; 319:19-23.

Speiser PW, Agdere L, Ueshiba H, White PC, New MI. Aldosterone synthesis in salt-wasting congenital adrenal hyperplasia with complete absence of adrenal 21-hydroxylase. *N Engl J Med*. 1991; 324: 145–149.

Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusié-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.

Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, Meyer-Bahlburg HF, Miller WL, Montori VM, Oberfield SE, Ritzen M, White PC. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95: 4133-60.

Stoner E, Dimartino-Nardi J, Kuhnle U, Levine LS, Oberfield SE, New MI. Is salt-wasting in congenital adrenal hyperplasia due to the same gene as the fasciculata defect? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1986; 24: 9–20.

Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Mikami A, Cutler GB Jr. Mutations of the CYP21 gene in nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency in Japan. *Endocr J*. 1998; 45: 493-7.

Therrell BL, Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, Simmank J, Korman K, Prentice L, Gonzalez J, Gunn S. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. *Pediatrics*. 1998; 101: 583–590.

Therrell BL. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2001; 30: 15-30.

Therrell BL, Adams J. Newborn screening in North America. *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30: 447–65.

Trapp CM, Oberfield SE. Recommendations for treatment of nonclassic congenital adrenal hyperplasia (NCCAH): an update. *Steroids.* 2012; 77: 342–26.

Tusié-Luna MT, White PC. Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92: 10796-800.

Ugrin M, Milačić I, Skakić A, Klaassen K, Komazec J, Pavlović S, Stojiljković M. Molecular genetic strategy for diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in Serbia. *Genetika.* 2017; 49: 457-67.

Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet.* 1990; 46: 1178-86.

Vrzalová Z, Hrubá Z, Šťahlová Hrabincová E, Pouchlá S, Votava F, Koloušková S, Fajkusová L. Identification of CYP21A2 mutant alleles in Czech patients with 21-hydroxylase deficiency. *Int J Mol Med.* 2010; 26: 595-603.

Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 1145–1152.

White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83: 5111–5.

White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta hydroxylase isozymes. *Endocr Rev.* 1994; 15: 421–38.

White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000; 21: 245–291.

Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 2322-9.

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.

Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, Cohen JB. Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 4081-8.

Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Trucco M, Hoffman EP. Evidence for a Heterozygote Advantage in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 2097-101.

Witchel SF, Lee PA. Identification of heterozygotic carriers of 21-hydroxylase deficiency: Sensitivity of ACTH stimulation tests. *Am J Med Genet.* 1998; 76: 337-342.

Witchel SF, Aston CE. The role of heterozygosity for CYP21 in the polycystic ovary syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000; 13: 1315-1317.

Wu DA, Chung BC. Mutations of P450c21 (steroid 21-hydroxylase) at Cys428, Val281, and Ser268 result in complete, partial, or no loss of enzymatic activity, respectively. *J Clin Invest.* 1991; 88: 519 –523.

Yang Z, Mendoza AR, Welch TR, Zipf WB, Yu CY. Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations. *J Biol Chem.* 1999; 274: 12147–12156.

Zhao B, Lei L, Kagawa N, Sundaramoorthy M, Banerjee S, Nagy LD, Guengerich FP, Waterman MR. Three-dimensional structure of steroid 21-hydroxylase (cytochrome P450 21A2) with two substrates reveals locations of disease-associated variants. *J Biol Chem.* 2012; 287: 10613–22.

Zhou Z, Agarwal VR, Dixit N, White P, Speiser PW. Steroid 21-hydroxylase expression and activity in human lymphocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 127: 11–18.

BIOGRAFIJA AUTORA

Iva Milačić je rođena 3.7.1981. godine u Beogradu, gde je stekla osnovno i srednje obrazovanje. Na smeru Molekularna biologija i fiziologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, diplomirala je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,23. Eksperimentalni deo diplomskog rada pod nazivom „Analiza polimorfizama u regulatornom regionu *DHFR* gena i ishod bolesti kod dece obolele od akutne limfoblastne leukemije (ALL) nakon tretmana sa MTX.” je uradila u istraživačkom kancerološkom centru Charles Bruneau, Sainte-Justine Bolnice, Univerziteta u Montrealu, Kanada. Školske 2010/2011. godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Biologija, modul Genetika. Novembra 2014. godine je na istom fakultetu završila specijalističke akademske studije iz biologije sa prosečnom ocenom 9,86.

Od decembra 2009. godine je zaposlena u Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front”, prvo na Odeljenju za artificijelne reproduktivne tehnologije, a od 2014. godine u genetičkoj laboratoriji, Odeljenja laboratorije. Tokom 2014. godine boravila je u laboratoriji za molekularnu citogenetiku, Instituta za humanu genetiku, Univerziteta Fridrih Šiler u Jeni, Nemačka (Stipendija nemačke službe za akademsku razmenu (DAAD)), dok je 2013. godinu provela na usavršavanju na odseku za medicinsku citogenetiku „Prof. Dr. Slavka Morić Petrović”, Instituta za mentalno zdravlje (IMZ) u Beogradu..

Do sada je objavila dva rada u časopisima od međunarodnog značaja, jedan rad u časopisu od nacionalnog značaja i imala je šest saopštenja na naučnim skupovima.

Прилог 1.

Изјава о ауторствуИме и презиме аутора Ива МилачићБрој индекса Б3026/2010**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом

Молекуларно-генетичка основа конгениталне адреналне хиперплазије у Србији:
карактеризација мутација у CYP21A2 гену

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутораУ Београду, 31.07.2017.

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Ива Милачић _____

Број индекса _____ Б3026/2010 _____

Студијски програм _____ Биологија, модул генетика _____

Наслов рада _____ Молекуларно-генетичка основа конгениталне адреналне хиперплазије
у Србији: карактеризација мутација у *CYP21A2* гену _____

Ментор _____ др Милена Угрин, др Соња Павловић _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____ 31.07.2017. _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Молекуларно-генетичка основа конгениталне адrenalне хиперплазије у Србији: карактеризација мутација у CYP21A2 гену

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____ 31.07.2017. _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.