

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE’DE 21-OHD HASTALARINDA CYP21
GENİNDE EN SIK RASTLANAN 9
MUTASYONUN SIKLIKLARININ SAPTANMASI**

Faegheh SADEGHİ

**TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ajlan TÜKÜN**

2006 - ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Genetik Doktora **Programı**

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez savunma Tarihi : 03/ 07/ 2006

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Jüri Başkanı

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay.....	ii
İçindekiler.....	iii
Önsöz.....	v
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vi
Şekiller Dizini.....	vii
Çizelgeler Dizini.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Konjenital Adrenal Hiperplazi.....	1
1.1.1 Steroid Sentezi Regülasyonu.....	3
1.1.2 İç ve Dış Genital Farklılaşması.....	4
1.2 21-Hidroksilaz Defekti (21-OHD).....	5
1.2.1 Klasik Tuz Kaybettiren Formu.....	6
1.2.2 Klasik Basit Virilizan Formu	6
1.2.3 Non-Klasik Formu.....	7
1.2.4 Epidemiyoloji.....	8
1.2.5 Tanı.....	9
1.2.6 Moleküler Genetik.....	9
1.2.7 21-OHD’de Genotip-Fenotip İlişkisi.....	12
1.2.8 Tedavi.....	14
1.2.9 21-OHD’de Prenatal Tanı ve Tedavi.....	15
1.2.10 Amaç.....	17
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	18
2.1 DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu.....	18
2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	19
2.3 RFLP.....	22
3. BULGULAR.....	29

4. TARTIŞMA	37
4.1 Alel Sıklığı ve Dağılımı.....	37
4.2 Genotip-Fenotip İlişkisi.....	40
4.3 “Compound” Heterozigotluk ve Akraba Evliliği	41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46
Ek1	49
Ek 2	51
ÖZGEÇMİŞ	52

ÖNSÖZ

Bu tezin oluşum sürecinde her aşamada bana destek veren, yol gösteren sayın danışmanım Prof. Dr. Ajlan Tükün'e;

Deneylerimin gerçekleştirilmesi sırasında hiç bir yardımını esirgemeyen sayın Uz. Dr.Nüket Yürür Kutlay'a;

Beni sonuna kadar destekleyen anabilim dalımız akademik ve idari personeline;

Destek ve sabırları için oğlum ve eşime;

Teşekkür ederim.

SIMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	A drenocorticotropin H ormone
AMH	A nti M ülleriye n H ormon
BV	B asit V irilizan
3B- HSD	3 -beta H idroksisteroid D ehidrogenaz enzimi
CRF	C orticotropin R eleasing F actor
CYP	S ytochrom P 450
CYP21P	CYP21 psödogeni
DHEA	D ehidroepiandrostone
GnRh	G onadotropin R eleasing h ormone
KAH	K onjenital A drenal H iperplazi
LHRH	L uteinizing- H ormone R eleasing H ormone
21-OHD	21-Hidroksilaz D efekti
17-OHP	17 -OH Progesteron
PCR	P olimerase C hain R eaction
RFLP	R estriction F ragment L ength P olymorphism
SDS	S odyum D odesil S ülfat
StAR	S teroidogenik A kut R egulatuar P rotein
TBE	T ris- b orate
TK	T uz K aybettiren

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Steroid hormon biyosentez yolu.....	3
Şekil 1.2. 21-Hidroksilaz defektinde klinik bulgu spektrumu.....	8
Şekil 1.3. CYP21, CYP21P gen ve çalışılan mutasyonların lokalizasyonu.....	11
Şekil 1.4. 21-OHD’de Genotip-Fenotip ilişkisi.....	14
Şekil 1.5. Riskli gebeliklerde şüpheli 21-hidroksilaz defekti olan fetusların prenatal tedavi algoritması.....	17
Şekil 2.1. PCR için kullanılan forward, reverse primerler ve mutasyonların gen üzerindeki yeri.....	21
Şekil 2.2. 8bp’lik mutasyonunun jel görüntüsü.....	24
Şekil 2.3. BD mutasyonunun jel görüntüsü.....	24
Şekil 2.4. IVS2 mutasyonunun jel görüntüsü.....	25
Şekil 2.5. P30L mutasyonunun jel görüntüsü.....	25
Şekil 2.6. I172N mutasyonunun jel görüntüsü.....	26
Şekil 2.7. E6 Cluster mutasyonunun jel görüntüsü.....	26
Şekil 2.8. V281L mutasyonunun jel görüntüsü.....	27
Şekil 2.9. Q318X mutasyonunun jel görüntüsü.....	27
Şekil 2.10. R356W mutasyonunun jel görüntüsü.....	28
Şekil 3.1. Saptanan mutasyonların tiplerine göre sıklıkları.....	30
Şekil 3.2. Çalışılan 100 hastada CYP21 en sık rastlanan ve çalışılan 9 mutasyonun alel sıklıkları.....	35
Şekil 3.3. Tuz kaybettiren formlu 50 KAH hastasında CYP21 geninde en sık rastlanan 9 mutasyonun alel sıklıkları.....	36
Şekil 3.4. Basit virilizan formlu 50 KAH hastasında CYP21 geninde en sık rastlanan 9 mutasyonun alel sıklıkları.....	36
Şekil 4.1. Alellerin Türkiye’de bölgelere göre dağılımı.....	39
Şekil 4.2. Türkiye’de bazı otozomal resesif hastalıklar için ebeveyn akrabalığı sıklıkları.....	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 21-OHD'deki mutasyonların sıklığı.....	11
Çizelge 1.2. Enzim aktivitesine göre CYP21gen mutasyonların sınıflandırılması.....	13
Çizelge 2.1. Kullanılan primer dizinleri.....	20
Çizelge 2.2. PCR ürün uzunluğu, restriksiyon enzimi kesim bölgeleri, normal ve homozigot bireylerde kesimden sonra elde edilen fragmanların uzunluğu.....	23
Çizelge 3.1. 21-OHD saptanan 100 hastanın tanı yaşı, akraba evliliği, aile öyküsü, doğum yeri, klinik tanısı ve CYP21 gen mutasyonları.....	31
Çizelge 3.2. 21-OHD'li 100 Türk hastada saptanan mutasyonların sıklığı.....	34
Çizelge 4.1. Bazı ülkelerde CYP21 gen mutasyonlarının alel sıklığı (%) dağılımı.....	38

1. GİRİŞ

1.1 Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), adrenal bezinde kortizol sentezi için gerekli olan 5 enzimden birinde defekt sonucu ortaya çıkmaktadır. KAH otozomal resesif kalıtlı ve kuşku genitalya'nın nedenlerinden birisini oluşturmaktadır. Konjenital adrenal hiperplazi insidansı her 5000-18000 yeni doğanda 1 olarak bildirilmiştir. En sık görülen enzim defekti (>%90) 21-hidroksilaz defektidir. Klasik ve klasik olmayan (=non-classical) olarak iki gruba ayrılır ve klasik formun iki tipi vardır: Tuz kaybettiren formu (%75) ve virilizan formu (%25). İkinci sıklıkta görülen enzim defekti 11-beta hidroksilaz enzimi defektidir (%5-8) (Uwaifo ve Merke, 2003). Daha az görülen diğer enzim defektleri (%2-5); 3-beta hidroksilaz, 17-alfa hidroksilaz/17,20 liyaz ve steroidogenik akut regülatör protein (Lipoid hiperplazi) defektidir (White ve Speiser, 2000; Frindik, 2003; Speiser ve White, 2003; New ve Betensky, 2004; Stratakis ve Bossis 2004; Votava ve ark., 2005).

Adrenal bez anatomik olarak 3 bölgeye ayrılmaktadır:

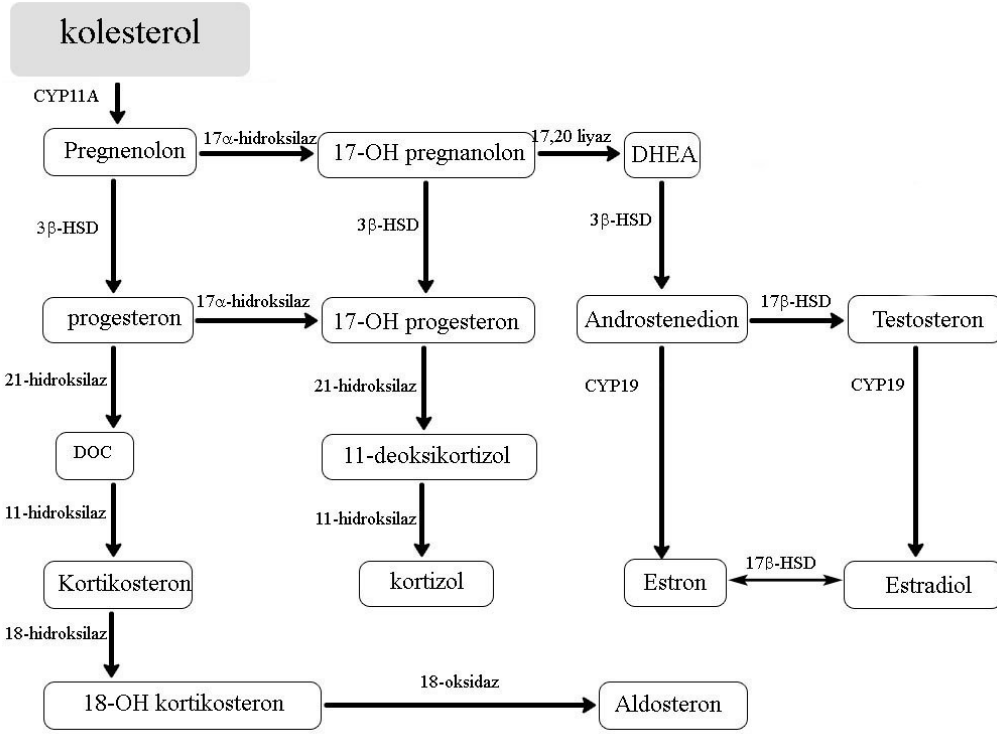
- 1) Zona glomerulosa: Ağırlıklı olarak mineralokortikoidlerin sentezlendiği tabaka.
- 2) Zona fasciculata: Ağırlıklı olarak glukokortikoidlerin sentezlendiği tabaka.
- 3) Zona retikularis: Ağırlıklı olarak androjenlerin sentezlendiği tabaka.

Adrenal hormonların sentezinin ilk aşaması, kolesterolün mitokondri dış zarından iç zarına doğru transportudur. Steroidogenik akut regülatuar protein (StAR) bu transportu gerçekleştirir. ACTH ve kalsiyum, bu transportu hızlandırır. Steroid sentezindeki ilk enzimatik aşama kolesterolün pregnenolona dönüşmesidir (şekil 1.1). Bu reaksiyon mitokondrial sitokrom p450 enzimi olan CYP11A ile gerçekleşir. Pregnenolon, steroid hormonların sentezinde öncül madde olarak kullanılmaktadır. Glomeruloza tabakasında mineralokortikoidlerin sentezi için endoplazmik retikulum

ve mitokondride yer alan 3-beta hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi (3β - HSD) pregnenolonu progesterona dönüştürür ve şekil 1'de gösterildiği gibi 4 farklı enzimatik reaksiyondan sonra aldosteron sentezlenir (White ve Speiser, 2000; Frindik, 2003).

Kortizol sentezi için fasikulata ve retikularis tabakalarındaki endoplazmik retikulum enzimi olan CYP17 (P450c17,17- α hidroksilaz/17,20 Lyase) pregnenolonu 17 α -hidroksipregnenolona dönüştürür ve 3β -HSD enzimi etkisiyle 17- α hidroksiprogesterona dönüşür. Bir sonraki basamakta 17- α hidroksiprogesteron, CYP21 enzimi etkisiyle 11-deoksikortizola ve bu da mitokondrial CYP11B1 ile kortizole dönüşür (White ve Speiser, 2000).

Adrenal korteksin retikularis tabakasında ve gonadlarda CYP17 enziminin 17,20 liyaz aktivitesiyle, 17 α -hidroksipregnenolon, dehidroepiandrosterone (DHEA) dönüşür ve bir sonraki aşamada 3β HSD enzim etkisiyle androstenediona ve gonadlarda 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi vasıtasıyla testosterona dönüşür. Overdeki aromataz (CYP19) enzimi; androstenedion ve testosteronu, östrojen ve östradiole dönüştürebilir, ayrıca testosteron hedef dokuda 5 α -redüktaz enzimi sayesinde dihidrotestosterona metabolize olur (White ve Speiser , 2000; Speiser ve White, 2003).



Şekil 1.1 Steroid hormon biyosentez yolu (White ve Speiser, 2000'den alınmıştır).

1.1.1 Steroid Sentezi Regülasyonu

Adrenal hormon sentezi hipofiz bezinden salgılanan adrenokortikotropin hormonu (ACTH) tarafından düzenlenir. Bu hormon kolesterolün pregnenolona dönüşmesini 2-6 dakikada 10 kat hızlandırır. Ayrıca hipotalamus bezinden salgılanan kortikotropin-“releasing” faktör (CRF) ve vazopresin sinerjik olarak ACTH salınımını indükler. ACTH artışının direkt etkisi kolesterol desmolaz enzimi için substrat olan kolesterol miktarının artmasıdır. Hipotalamus-hipofiz-adrenal sisteminde negatif geri bildirim kortizol tarafından yapılır. Adrenal enzim defektinde kortizol miktarı düşer ve ACTH salınımı artışıyla birlikte adrenal kortekste hiperplaziye yol açar (Rimoin ve ark., 2002, bölüm 84; Marshal ve New, 2003).

1.1.2 İç ve Dış Genital Farklılaşması

Embriyogenezisin 8. haftasına kadar Wolf ve Müller kanalları birlikte bulunur. Bu dönemden sonra sadece bir kanal sistemi gelişir, bu sistem özel kanal ve bezlere dönüşürken, diğeri işlevsiz hale gelerek kaybolur (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Testosteron, fetal testislerden Leydig hücreleri gelişince (8. hafta) salgılanmaya başlar. Testosteron, Wolf kanal sisteminin epididim, vas deferens ve seminal kanallara gelişimini uyarır (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

SRY geni ve testis yokluğunda, anti mülleriyan hormon (AMH) eksikliği sonucu ve fetal overlerin ürettiği östrojen etkisiyle Müllerian sistemden fallop tüpleri, uterus ve üst vagina gelişir. Testosteron yokluğunda Wolf kanalı geriler (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Bipotansiyel dönemde (6. haftaya kadar) dış genitaler genital tüberkül, ürogenital sinus ve iki lateral labioskrotal şişlikten oluşur. Her iki kanal sisteminin de beraber olduğu iç genitalerin aksine, dış genitaler nötral olup gonadal steroid hormon sinyallerine göre sadece ya dişi ya da erkek yapılarına dönüşürler (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Androjen etkisinin yokluğunda ürogenital sinüs katlanması açık kalır, labia minusları oluşturur, labioskrotal katlantılar labia majörleri oluşturur, genital tüberkülden klitoris ve ürogenital sinüsten vagina ve üretra oluşur (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Embriyo gelişiminin kritik dönemlerinde androjenlere maruziyet çeşitli ölçülerde maskülinizasyona yol açar. 9-14. haftalardaki androjen maruziyeti bazal dişi fenotipinde klitoral hipertrofi ve hipospadias gibi farklılıklara yol açar. Erkekte 12. haftada lokal androjen konsantrasyonu ya da aktivitesi yetersizse, yetersiz

maskülinize olmuş dış genitaler olur. Erkek ve dişi dış genitalerin yapısal bozuklukları anormal androjeni gösterir (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Dişilerdeki konjenital adrenal hiperplazi dış genitalerin maskülinizasyonu ile karakterize olup, adrenal korteksten aşırı androjen üretiminin gösterilmesiyle tanı konulur. Androjen miktarı ve etkilenme süresine göre çeşitli derecelerde anatomik bozukluklar görülür. KAH olan dişilerde AMH salgılanmadığı için fallop tüpleri, uterus ve üst vagina normal gelişir, Wolf kanalı gelişimi olmaz, ancak dış genitaler değişebilir. 10. haftadan sonra, vagina ve üretra ayrıldıktan sonra aşırı androjenin etkisi sadece klitoral hipertrofi ile sınırlı olabilir. Ancak 12. haftadan önce aşırı androjen varlığı labiumların ilerleyici füzyonuna, ürogenital sinus oluşumuna ve hatta üretranın fallus boyunca kapanmasına (hipospadias) yol açar (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

Aşırı adrenal aktivitesi iç genitalerin farklılaşmasını etkilemez. Çünkü adrenal korteksin anlamlı olarak işlevsel olduğu 10-12. haftalardan önce iç genital gelişimi tamamlanır. Dişi dış genital fenotipi 20. haftaya kadar tamamlanmadığından, 10-12. haftalardaki erken androjen fazlalığı tamamen maskülinizasyona yol açabilir. Geç hiperandrojenizm (18-20. hf) sınırlı kuşkulu genital yapıya yol açar. Klitoris büyüklüğü androjen fazlalığının zamanlanmasından çok miktarıyla ilgilidir (Grumbach ve ark., 2003, Bölüm 22).

1.2 21-Hidroksilaz Defekti (21-OHD)

Konjenital adrenal hiperplazinin en sık görülen nedeni 21-hidroksilaz enzimi defektidir (%90-95). Şüpheli genital yapının en sık şekli ve neonatal ölümlerin en sık endokrin nedenidir. Klinik olarak klasik ve klasik olmayan olmak üzere iki ana formda gözlenir (New ve Betensky, 2004).

Klasik formda enzim defekti çok ağırdır. Klasik formun %75'ini tuz kaybettiren ve %25'ini basit virilizan tipi oluşturmaktadır. Yenidoğan bebeklerde tuz kaybettiren formu tuz kaybı krizi ile ortaya çıkar (New ve Betensky, 2004).

Klasik olmayan formda orta düzeyde enzim defekti vardır ve postnatal dönemde hiperandrojenizm ile ortaya çıkar. Bu formda kız bebekler doğumda virilize değildirler (New ve Betensky, 2004).

Klasik formun her iki tipinde de doğumda dışi psödohermafrodit bulguları gözlenirken klasik olmayan formunda klinik bulgular genellikle ergenlik ve sonrasında ortaya çıkar ve hirsutizm, adet düzensizliği ve infertiliteye neden olur (New ve Betensky, 2004).

1.2.1 Klasik Tuz Kaybettiren Formu

21- OHD'in klasik formunda fonksiyon kaybı çok ağırdır. Vakaların 2/3-3/4 'ünde adrenal aldosteron, sodyum Emilimi için yeterli değildir ve bu hastalar tuz kaybından, kortizol defektinden ve androjen artışından etkilenirler. Yenidoğan bebeklerde beslenme güçlüğü, kilo kaybı, gelişme geriliği, kusma, dehidratasyon, hipotansiyon, hiponatremi ve hiperkalemi adrenal krize (azotemi, vaskular kollaps, şok ve ölüm) neden olur. Adrenal kriz, yaşamın ilk 4 haftasında ortaya çıkar ve erkek çocuklar bunun için daha risklidirler. Çünkü yenidoğan tarama programlarında dış genital yapıları normal olduğundan gözden kaçabilir ancak, kız çocuklarda kuşku dış genital yapı nedeniyle daha erken tanı konulabilir. Bu formda dış genital belirsizliğin şiddeti enzim defekti ile ilgili değildir. İç genital yapı normaldir (New ve Betensky, 2004).

Tedavi olmayanlarda, aşırı androjen maruziyeti nedeniyle penis veya klitoral büyüklük, erken puberte ve akne ortaya çıkabilir. Çocukluk döneminde daha hızlı büyüme epifizlerin erken kapanmasına neden olur ve sonuçta boy kısalığı ortaya çıkar. Kız çocuklarda, adet düzensizliği, primer veya sekonder amenore ortaya

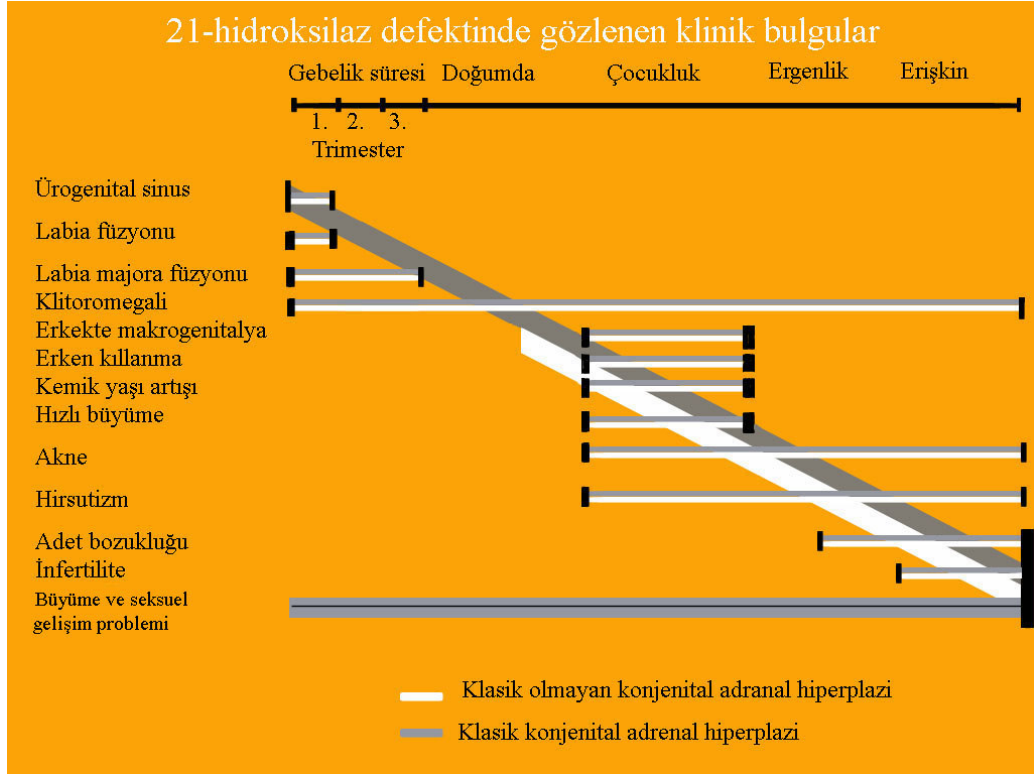
çıkabilir. Bu hastalarda fertilité düşüktür ve ender olarak gebelik bildirilmiştir. Erkeklerde testiküler fonksiyon, spermatogenez ve fertilité normaldir. Testis maturasyonunun eksik tedavide yetersiz olabileceği bildirilmiştir. (Deaton ve ark.,1999; Marshall ve New, 2003; New ve Betensky, 2004) (şekil 1.2).

1.2.2 Klasik Basit Virilizan Formu

Bu formun en belirgin özelliği ilerleyici virilizasyon ve somatik gelişmenin hızlı olmasıdır. Bu formda da kız çocukların erken tanı alma şansı erkek çocuklardan daha fazladır. Dişilerde kuşkulu genital yapı; hafif klitoral büyüklük, labioskrotal katlantının farklı derecelerde füzyonu ve hatta penis oluşumu ile ortaya çıkabilir. Genetik cinsiyet ve gonadal farklılaşma 21-OHD'de normaldir. Her iki cinsiyette de erken tanı konulması çok önemlidir. Uzun süreli androjen artışı hipofiz-gonad yolunu baskılar ve testis olgunlaşmasını engelleyerek infertiliteye neden olabilir. Her iki cinsiyette erken epifiz kapanması nedeniyle boy kısalığı ortaya çıkar. Bu hastalarda gebe kalma ve doğum yapma olasılığı, tuz kaybettiren formu hastalardan daha yüksektir (Deaton ve ark.,1999; Marshall ve New, 2003; New ve Betensky, 2004) (şekil 1.2).

1.2.3 Non-Klasik Formu

Klasik formdan daha sıktır. Her yaşta izlenebilir ama, genellikle ileri yaşta ortaya çıkar ve hafif seyreder. Erken puberte ve kemik yaşı artışı gibi değişik hiperandrojenizm bulguları verebilir. Kuşkulu genitalya ortaya çıkmaz. Sadece akneyle kendini gösterebilir. Sık olarak adet düzensizliği, sekonder amenore, oligoamenore ve hirsutizm klinik bulgular içinde yer almaktadır. Hasta olan kadınların %60'ında hirsutizm, %54'ünde oligomenore ve %33'ünde akne görülmektedir (şekil 1.2). Erkeklerde androjen artışına bağlı klinik bulgular zor tanımlanabilir ve bunlar erken puberte, boy kısalığı ve fertilitede azalma şeklinde olabilir (Moran ve ark.,2000).



Şekil 1.2 21-Hidroksilaz defektinde klinik bulgu spektrumu (Marshall ve New, 2003'den alınmıştır).

Bu hastaların bir grubu tamamen asemptomatikler ve ancak farklı nedenlerden dolayı incelendiklerinde tanı alırlar (Speiser ve ark., 2000; Deneux ve ark., 2001; Speiser ve White, 2003).

1.2.4 Epidemiyoloji

Konjenital adrenal hiperplazi otozomal resesif kalıtılır ve kadın erkek oranı eşittir. Klasik 21-OHD'nin farklı populasyonlardaki insidansı her 15,000 canlı doğumda 1 olarak bildirilmiştir. En çok izlendiği topluluk ise Alaskalı Yupik Eskimoları olup buradaki sıklık 300 canlı doğumda 1'e ulaşır (New ve Betensky, 2004).

Klasik olmayan formun insidansı daha yüksektir ve populasyonlar arasında farklılık gösterir. New York'ta %1 iken, bazı etnik gruplarda örneğin Aşkenazilerde 1/27'ye ulaşmaktadır (New ve Betensky, 2004).

1.2.5 Tanı

Klinik bulguların saptandığı kişilerde, steroid öncüllerin serum konsantrasyonu ölçümleri genellikle tanı koydurucudur. Moleküler genetik çalışmaları da tanı amaçlı kullanılmaktadır. 21-OHD'de serumda 17-OHP düzeyine bakılabilir. Normalde 100 ng/dl'nin altında olan 17-OHP düzeyi için 800 ng/dl üzerindeki değerler tanı koydurucudur. 17-OHP düzeyi klasik formda 20,000 ng/dl ve non klasikte 2,000-15,000 ng/dl arasında değişir (New ve Betensky, 2004).

Klasik olmayan KAH belirteci artmış 17-OHP düzeyi ve ACTH uyarısı sonrası dramatik azalmaz. Artmış 17-OHP değerleri genellikle tek başına yeterli değildir. Bu yüzden ACTH uyarı testi kullanılmalıdır (Zarkovic ve ark.,1999). Ayrıca tanı amaçlı olarak diğer steroid öncülleri olan pregnenolon, 17 hidrokspregnenolon, dehidroepiandrosteron, 11-deoksikortikosteroid ve testosteron düzeyi ölçümleri de kullanılmaktadır (New ve Betensky, 2004).

1.2.6 Moleküler Genetik

21 hidroksilaz, mikrozomal sitokrom P450 enzimidir. Geni CYP21 yada CYP21A2 olarak adlandırılır. CYP21 geni 6. kromozomun kısa kolunda HLA kompleksinin hemen yanındadır (6p21.3). CYP21 geni HLA-B ve HLA-DR arasında yer almaktadır. CYP21 geni ve onun inaktif homologu olan CYP21P psödogeni kompleman sisteminin 4. komponentini kodlayan C4B ve C4A genlerinin hemen yanında yer almaktalar (Pinterova ve ark., 2000; Lee 2001) (Şekil 1.3).

CYP21 ve CYP21P 10'ar ekzon içermektedir. CYP21P psödogeni, CYP21 geni ile %98 homoloji gösterir ve içerdiği 15 farklı mutasyondan dolayı inaktif durumdadır. CYP21P ekzon 3'te 8bp'lik delesyonu, ekzon 7'de kalıp kaydırma mutasyonuna neden olan timidin insersiyonu ve 8. ekzonda 318. kodonda C-T nonsense mutasyonunu içermektedir (Higashi ve ark., 1986).

Bu yüksek derecede homoloji iki tip mutasyona yol açar:

- 1) Mayozda eşit olmayan krosing over nedeniyle CYP21 geninde delesyonlar veya duplikasyonlar gelişir.
- 2) CYP21 geninin CYP21P'ye gen dönüşümüne neden olur (Tusie-Luna ve White, 1995; Higashi ve ark., 1988).

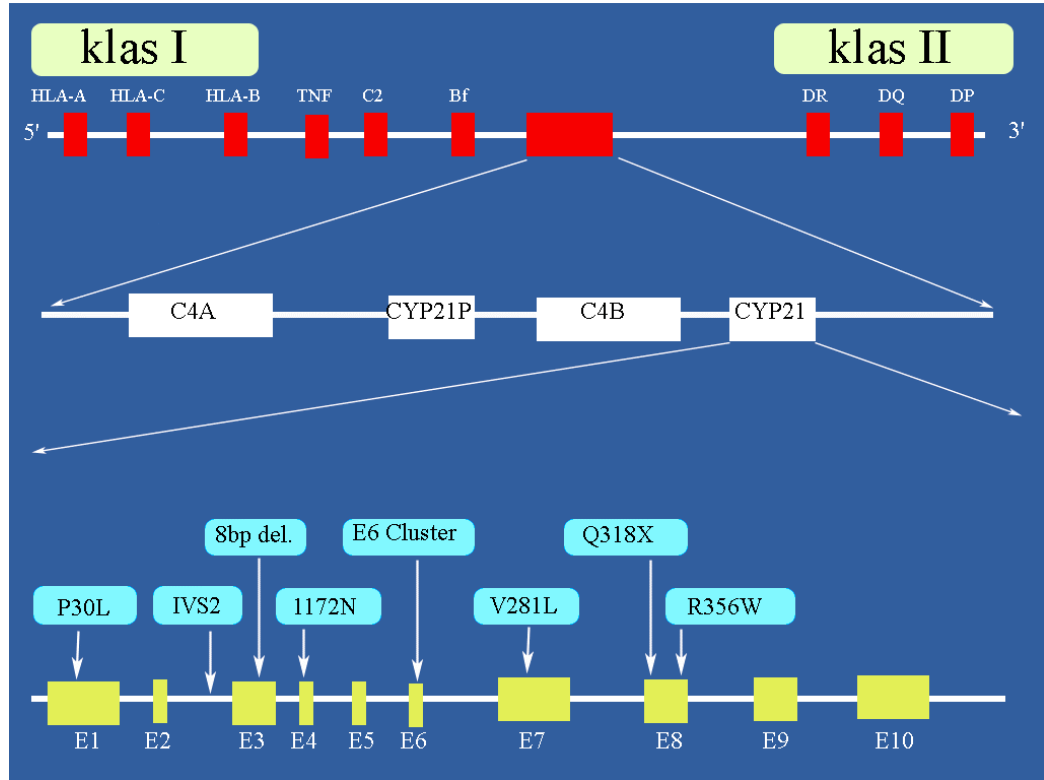
Gen dönüşümü, mutasyonların %75'inin nedenini oluştururken, mayotik rekombinasyon mutasyonların %20'sine yol açar. Yaklaşık 60 farklı mutasyon, mutasyonların geri kalan %5'ini oluşturmaktadır. Hastaların %1'inde spontan mutasyon saptanmaktadır (Speiser ve ark., 1992; New ve Betensky, 2004).

CYP21 geni insandaki polimorfik genlerden birisidir ve 5 normal varyantı mevcuttur: insL9, K102R, D183E, S268T ve N493S (New ve Betensky, 2004).

Moleküler çalışmalarda hasta ve taşıyıcı bireylerin %90-95'inde en sık 9 mutasyon ve gen delesyonu saptanmaktadır (Çizelge 1.1) (New ve Betensky, 2004), (Şekil 1.3).

Hastaların büyük kısmı "compound" heterozigottur (Krone ve ark., 2000; Merke ve Bornstein, 2005). Klasik 21-OHD'de en sık görülen mutasyon (%50) 2. intronda A/C659G (IVS2) mutasyonudur. Homozigot mutasyon, enzim aktivitesini %1'in altına düşürür ve tuz kaybettiren hastalarda ortaya çıkar (Wilson ve ark., 1995).

Delesyonlar, CYP21 geninin bütünüyle kaybı veya 3. ekzonda 8bp'lik delesyon şeklinde meydana gelir ve tuz kaybettiren hastaların %20'sinde saptanmaktadır (New ve Betensky, 2004).



Şekil 1.3 CYP21, CYP21P gen ve çalışılan mutasyonların lokalizasyonu (www.compgene.com'dan alınmıştır).

Çizelge 1.1 21-OHD'deki mutasyonların sıklığı (New ve Betensky, 2004'ten alınmıştır).

Sıklık		Mutasyon
~ %90-95	%50	A/C659G (intron2 splice mutasyonu)
	%20	delesyonlar (gen delesyonu ve 3. ekzonda 8bp'lik delesyon)
	%20-25	P30L, I172N, Ekzon 6 cluster mutasyonu, V281L, F306+t, Q318X, R356W, P453S
~ %5-10		Diğer aleller

1.2.7 21-OHD'de Genotip-Fenotip İlişkisi

Enzim aktivitesine göre alleller iki gruba ayrılırlar: ağır ve hafif alleller. Genellikle klinik bulguların ağırlığı ile mutasyon tipi arasında iyi bir korelasyon mevcut olmakla birlikte (Werkmeister ve ark., 1986; White ve ark., 1994), her zaman bu ilişki gözlenmez (Wilson ve ark., 1995; Krone ve ark., 2000).

Enzim aktivitesine göre hastalar 4 kategoride incelenebilir:

- 1) Enzim aktivitesi %0 olanlar.
- 2) Enzim aktivitesi %1'in altında olanlar.
- 3) Enzim aktivitesi %1-11 arasında değişenler.
- 4) Enzim aktivitesi %20-50 arasında değişenler (Çizelge 1.2).

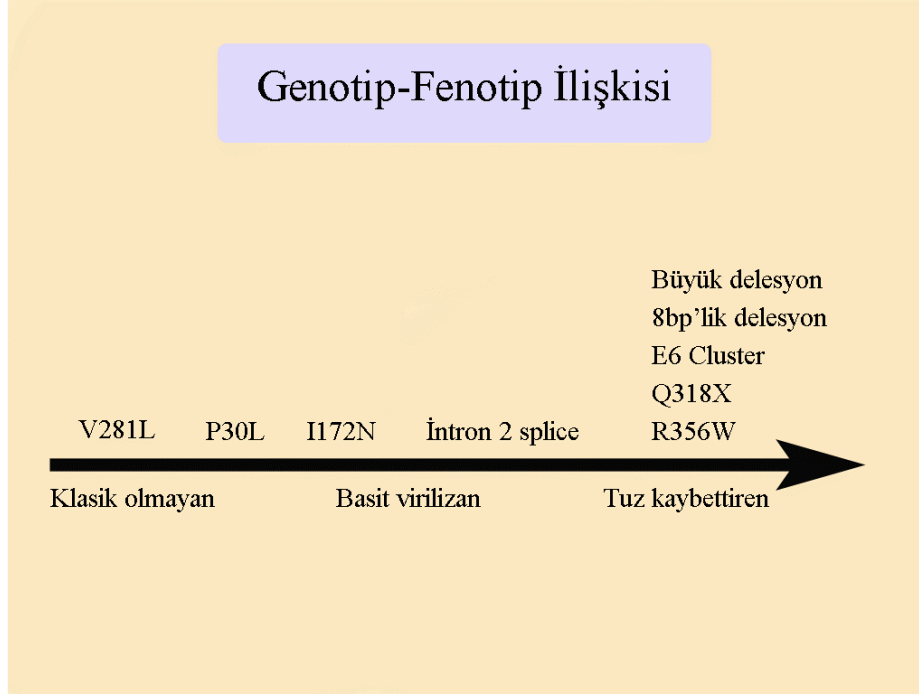
Klasik 21-OHD'de CYP21 genin her iki allelinde ağır mutasyon vardır ve tuz kaybettiren formda enzim aktivitesi hiç yoktur (New ve Betensky, 2004).

Non-klasik formda hastalar her iki allelde iki hafif mutasyon veya bir alelde ağır ve diğesinde hafif mutasyon taşımaktadırlar. Bu tip enzim defektinde hastaların 2/3'ü "Compound" heterozigotturlar (New ve Betensky, 2004).

Çizelge 1.2 Enzim aktivitesine göre CYP21 gen mutasyonların sınıflandırılması (Krone ve ark., 2000'den alınmıştır).

Enzim aktivitesi	Hastalık seyri	Mutasyon
%0	Ağır (Klasik)	Gen delesyonu, büyük gen dönüşümü, 3. ekzon da 8bp'lik delesyon, ekzon 6 cluster mutasyonu, F306+t, Q318X ve R356W
<%1		A/C 659G (İntron 2 ayıklanma bölge mutasyonu) (IVS2)
%1-11		I172N
~%20-50	Orta (Klasik olmayan)	P30L V281L P453S

Çizelge 1.2'de gösterildiği gibi ilk grupta delesyonlar ve nonsense mutasyonlar sonucu enzim aktivitesi tamamen kalkmıştır. Bu tip mutasyonlar genelde tuz kaybettiren formda ortaya çıkar. Diğer grupta yanlış anlamalı I172N mutasyonu sonucu enzim aktivitesi %1-11'e düşer, bu hastalarda aldosteron sentezi yapılabilir ve basit virilizan tip ortaya çıkar. Son grupta enzim aktivitesi %20-50 arasında değişir ve bu mutasyonlara örnek olarak V281L, P30L verilebilir. Bu mutasyonlar genellikle non-klasik formda görülmektedir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 21-OHD'de Genotip-Fenotip ilişkisi (www.compgene.com'dan alınmıştır).

1.2.8 Tedavi

Klasik formda erken tanı ve tedavi çok önemlidir. Tedavi iki şekilde olabilir: medikal ve cerrahi (New ve Betensky, 2004).

Medikal tedavide prensip eksik olan hormonun verilmesidir. Kortizol tedavisi, ACTH salınımını ve androjenik öncüllerin üretimini azaltır. Aşırı tedavi "Cushing" sendromuna ve büyüme geriliğine yol açar. Yetersiz tedavi ise boy kısıklığı, hirsutizm ve infertiliteye yol açabilir. Dolayısıyla tedavi sürekli 17-OHP, androstendion ve testosteron konsantrasyonlarının takibi ile yapılmalıdır (New ve Betensky, 2004).

Tuz kaybettiren formda hastaların tedavisine tuz tutucu hormon eklenmesi gerekir. Plasma renin aktivitesi normale döndüğünde ACTH ve androjen düzeyleri daha da düşer ve glukokortikoid dozu azaltılabilir (New ve Betensky, 2004).

Minör stresler adrenal androjenlerde kısa artışlar yapabilir ama doz ayarlaması gerektirmez. Ancak cerrahi gibi majör streslerde ek hormonal destek gereklidir (New ve Betensky, 2004).

Anatomik anomalilerin cerrahi tedavisi ilk bir kaç yıl içinde tercihen ilk 6 ayda yapılmalıdır (New ve Betensky, 2004).

Bunun yanısıra boy kısalığı için büyüme hormonu veya “gonadotropin releasing” hormon (GnRh) uygulanabilir. Erken puberte problemleri için “luteinizing-hormone releasing“ hormon analogları (LHRH) uygulanabilir. Son olarak da ağır 21-OHD olan hastalarda ve hormonal tedaviye cevap vermeyen hastalarda bilateral adrenalectomi yapılabilir (New ve Betensky, 2004).

21-hidroksilaz defekti olan farelerde gen tedavisi uygulanmıştır (Gotoh ve ark., 1994). İnsanda tıbbi tedavi ucuz ve efektif olduğu için gen tedavinin uygun olmayacağı düşünülmektedir. Ayrıca gen tedavisinde adrenal kortekste yüksek ekspresyon hedeflenmesi gerekmektedir. Gen tedavisinde en zor olan kısım adrenal androjenlerin baskılanmasıdır (White ve Speiser, 2000).

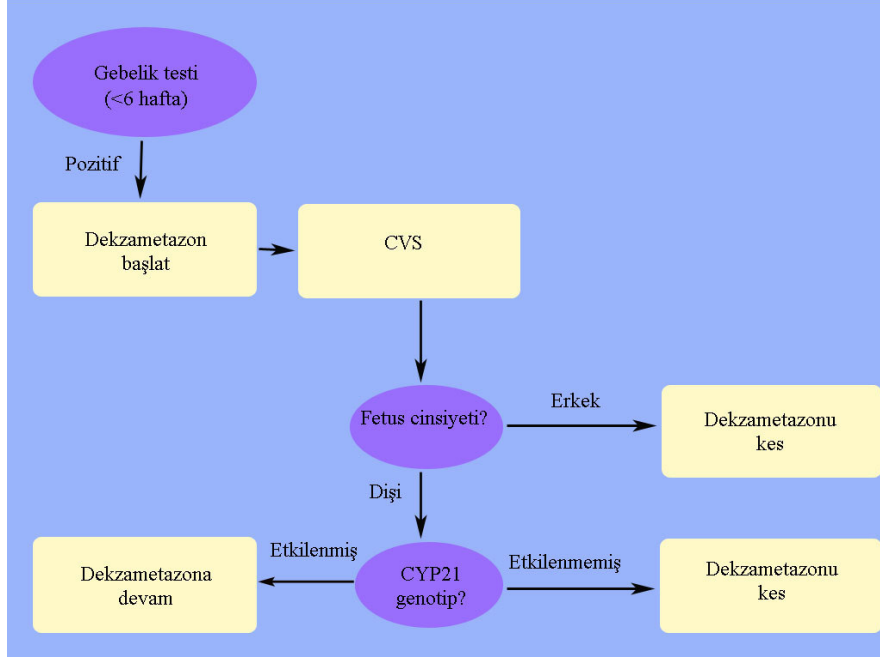
Non klasik 21-OHD: Bu hastalarda genelde tedavi gerekli değildir, çünkü hastaların çoğu hayatları boyunca asemptomatikler veya klinik bulguları ergenlik döneminde, puberteden sonra veya doğum yaptıktan sonra ortaya çıkar. Artmış kemik yaşı, ağır akne, hirsutizm, adet düzensizliği ve infertilite tedavi endikasyonu doğurabilir (New ve Betensky, 2004).

1.2.9 21-OHD’de Prenatal Tanı ve Tedavi

21 hidroksilaz eksikliğinde prenatal tanı intrauterin tedaviye olanak sağlaması yönünden önemlidir. Intrauterin dekzametazon tedavisi etkilenmiş kız fetuslarda virilizasyonun azalmasını sağlar, ayrıca klitoroplasti veya vaginoplasti gerekliliğini azaltır (Mercado ve ark., 1995) . Bu tedavi sonrası düşük doğum ağırlığı ya da boy

kısalığı bildirilmemiştir. Ancak bu tedavinin kalıcı skarlarla birlikte strialar, hiperglisemi, hipertansiyon, GIS semptomları ve duygusal bozukluklar gibi belirgin maternal yan etkileri vardır. Bu nedenle endikasyon olmaksızın deksametazon tedavi verilmemesi ve gebeliğin ikinci yarısından sonra dozun azatılması önerilmektedir (Lajik ve ark., 1998; Collett-Solberg, 2001; New ve ark., 2001).

Prenatal tanı amniyon sıvısında artmış 17-OHP ve androstenedion düzeyleri ile konulabilir. 17-OHP sadece tuz kaybettiren formda artabilirken androstenedion tüm formlarda artar. Daha hafif formlarda amniyon sıvısı değerleri normal olabileceğinden bu testler yerlerini moleküler genetik tanıya bırakmışlardır. Bu fetusların tedavisinde etik açıdan önemli bir nokta vardır: Bu hastalık otozomal resesif geçişlidir, eğer anne baba taşıyıcı ise sadece fetusların 1/8'inde KAH çıkması beklenir, yani fetusların 1/8 etkilenmiş bir dişi fetus olacaktır ve 7/8 etkilenmemiş fetuslerde gereksiz tedavi verilmiş olacaktır. Bu yüzden fetusların karyotip tayini ve moleküler çalışmalar tedavide önemlidir. Bu nedenle ilk olarak anne babada moleküler genetik çalışma yapılmalı ve ikisinin de taşıyıcı olup olmadıkları belirlenmelidir (Speiser ve ark., 1992; Day ve ark., 1996). Anne baba taşıyıcı ise gebeliğin 5.haftasında tedaviye başlanması önerilmektedir. Annenin ve fetusun gereksiz steroid alımını engellemek için olası en erken invazif tanı girişimlerinin seçilmesi uygun görülmektedir. Bu nedenle ideal olan, gebelik öncesinde ailedeki mutasyonun bilinmesi ve 7-10.haftalarda alınan koryon villus örneklerinden fetusun CYP21 mutasyonuna bakılmasıdır. Bunu takiben etkilenen dişi fetuslarda tedavi sürdürülürken, etkilenmemiş kız ve tüm erkek bebeklerde tedavi kesilir (White ve Speiser, 2000), (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Riskli gebeliklerde şüpheli 21-hidroksilaz defekti olan fetusların prenatal tedavi algoritması (White ve Speiser, 2000’den alınmıştır).

1.2.10. Amaç

Bu çalışmada 21-OHD olan 100 hasta bireyde dünyada en sık görülen 9 mutasyon olan 8bp’lik delesyon, büyük gen delesyonu, P30L, IVS2, I172N, V281L, Q318X, R356W ve Ekzon 6 cluster mutasyonlarının ülkemizdeki sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Proje, Ankara üniversitesi Tıp fakültesi Etik kurulunun 24.03.2005 tarihli toplantısında 7796 sayı ile onaylanmıştır. Bu araştırmada 21-OHD tanısı ile izlenen ve aynı aileden olmayan A.Ü.T.F., SSK Dışkapı Hastanesi ve Dr. Sami Ulus Çocuk Hastanelerinin Çocuk Endokrin bölümlerinden gönderilen 100 hasta ailesi çalışma hakkında bilgilendirilmiştir. Ek 1’de verilen bilgilendirilmiş onam formu ile onamı alınan hastalar için Ek 2’de verilen hasta kayıt formu doldurulduktan sonra her hastadan 5 ml periferik kan örneği alınarak EDTA’lı tüplere aktarılmıştır.

2.1 DNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

DNA izolasyonu, 5ml periferik kandan tuz çıkarımı yöntemiyle yapıldı.

- 5 ml periferik kan, 14 ml’lik santrifüj tüpüne aktarılıp 2500 rpm’de 20 dk santrifüjlendi (Hettich zentrifugen, Rotanta 460).
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 14 ml’ye kadar steril dH₂O eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra 60 dk buz üzerinde bekletildi.
- 1500 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 14 ml’ye kadar steril dH₂O eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra 1500 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 5 ml’ye kadar 1XSTE (10 mM Tris-HCl [Applichem, A2264,1000], 400 mM NaCl [Applichem, A2942,1000] ve 2 mM EDTA [Applichem, A5097,0500] pH 8.2) eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra 1500 rpm’de 15 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 4.5 ml’ye kadar 1XSTE ekleyip vorteksle karıştırıldı. Daha sonra karışımın üzerine 500 µl %10’luk SDS (Applichem, A1112,0100) ve 12.5 µl proteinaz K solüsyonundan (20 µg/µl [Applichem, A4392,0005]) eklenip yavaşça karıştırıldı ve bir gece 37 °C’de (Heraeus, FB 420) inkübe edildi.

- Karışım üzerine 1 ml doymuş NaCl (5.6M) eklenip 15 saniye kuvvetlice karıştırıldı ve 2500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine iki katı hacimde saf etanol (Appllichem, A3678,2500) eklenip DNA'nın presipite olması beklendi.
- Presipite olan DNA 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı. Tüpe 1.5 ml'ye kadar saf etanol eklenip 13000 rpm'de (Eppendorf, centrifuge 5417R) 10 dk santrifüje edildi.
- Süpernatant atılıp pellet üzerine 1 ml'ye kadar %70 etanol eklenip pellet kaldırıldı ve 13000 rpm'de 10 dk santrifüje edildi.
- Süpernatant atılıp pellet kurumaya bırakıldı (yaklaşık 30 dk).
- Kuruma işleminden sonra pellet üzerine 500 µl dH₂O eklenip DNA'nın çözülmesi için 37 °C etüve kaldırıldı ve bir gece inkübe edildi (Miller ve ark.,1988).
- Elde edilen DNA'nın miktar ve saflığı spektrofotometre (Jasco Spectrophotometer, V-530) ile ölçüldü.

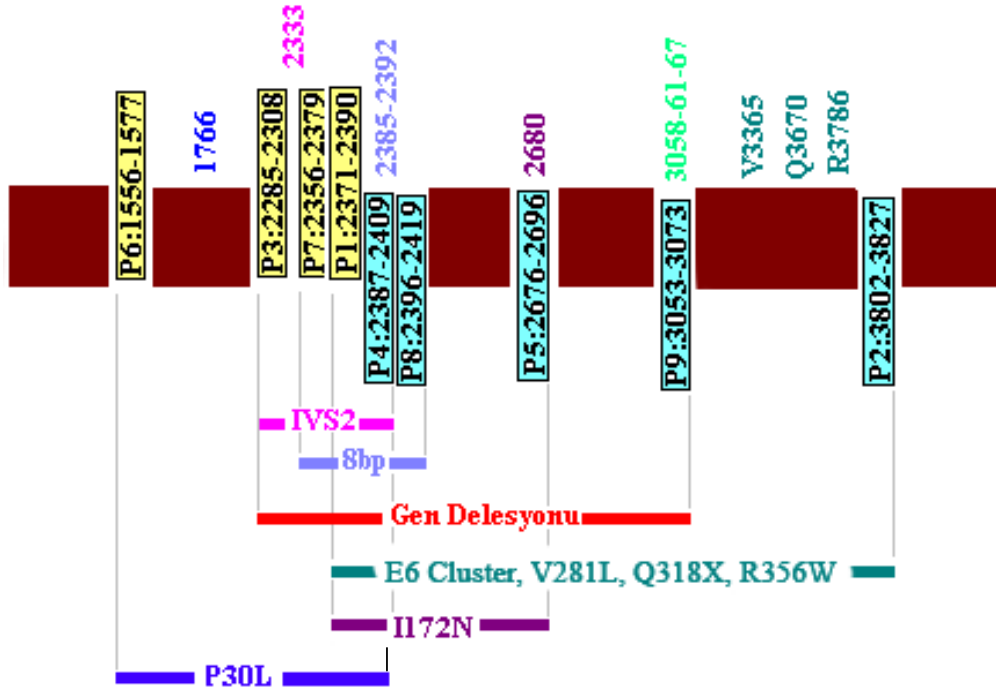
2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

8bp'lik delesyon, büyük gen delesyonu, P30L, IVS2, I172N, V281L, Q318X, R356W ve Ekzon 6 cluster mutasyonlarının incelenmesi için Çizelge 2.1'de listelenen primerler kullanıldı (Şekil 2.1).

Çizelge 2.1. Kullanılan primer dizinleri (Kharrat ve ark., 2003'den alınmıştır).

Mutasyon	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')
8 bp delesyon	P7/ GTCTAGGAACTACCCGGACCTGTC	P8/ CTTCTTGTGGGCTTTCCAGAGCAG
Büyük delesyon	P3/ AGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA	P9/ AGCTGCATCTCCACGATGTGA
P30L	P6/ TCGGTGGGAGGGTACCTGAA	P4/ GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC
IVS2	P3/ AGGTCAGGCCCTCAGCTGCCTTCA	P4/ GGCTTTCCAGAGCAGGGAGTAGTC
I172N	P1/ GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	P5/ TCTCCGAAGGTGAGGTACCAG
E6 Cluster	P1/ GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	P2/ GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTA
V281L	P1/ GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	P2/ GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTA
Q318X	P1/ GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	P2/ GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTA
R356W	P1/ GGACCTGTCCTTGGGAGACTAC	P2/ GCCGTGTGGTGCGGTGGGGCAAGGCTA

Her bir PCR uygulaması, 0.7 µg genomic DNA, 150 ng her primerden, 0.2 mM dNTP (Larova, dNTP-set 1), 1.5 mM MgCl (Applichem, A5324,0005), 10X PCR tamponu (Applichem, A4897,0005) ve 2.5 U Taq polimeraz enzimi (Applichem, A 5186,10000) içeren toplam 100 µl reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir (Kharrat ve ark., 2003).



Şekil 2.1. PCR için kullanılan forward (sarı), reverse (mavi) primerler ve mutasyonların gen üzerindeki yeri.

BD, 8bp'lik delesyon, IVS2, P30L ve I172N için kullanılan PCR protokolü:

Denatürasyon	95 °C, 60 saniye	31 döngü
Annealing	58 °C, 60 saniye	
Extension	72 °C, 60 saniye	

V281L, Q318X, R356W ve E6 cluster mutasyonları için kullanılan PCR protokolü:

Denatürasyon	95 °C, 60 saniye	31 döngü
Annealing	58 °C, 60 saniye	
Extension	72 °C, 90 saniye	

PCR ürünlerinin varlığını kontrol etmek amacıyla %1'lik agaroz jelde (Applichem, A2114,0050) elektroforez yapılmıştır. Jel 1X TBE'de (Tris base [Sigma,T8524], Borik asit [Sigma, B6768], 0.5 M EDTA) 0.5 µg/µl Ethidium

bromide (Applichem, A1151,0100) içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak agaroz jelde 90 V'da 1 saat yürütüldükten sonra (Electrophoresis power supply consort E452) reaksiyon sonuçları değerlendirilmiştir.

2.3 RFLP

Belirtilen mutasyonların incelenmesi için, PCR ürünleri (büyük delesyon ve 8bp'lik delesyon hariç) çizelge 2.2'de belirtilen restriksiyon enzimleriyle kesim yapılmıştır.

Kesim protokolu:

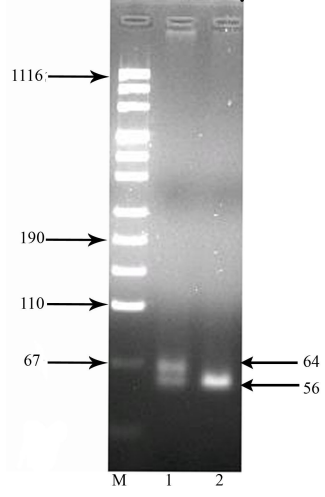
Kesim	37 °C 'de	16 saat
İnaktivasyon	65 °C'de	20 dakika

Kesim ürünleri, mutasyonların varolup olmadığını kontrol etmek için %3'lük agaroz jelde, 90 V'da 1-2 saat elektroforez yapılmıştır. PCR ürün uzunluğu ve kesimden sonra normal ve homozigot mutant bireylerde elde edilen fragmanların uzunluğu çizelge 2.2'de verilmiştir.

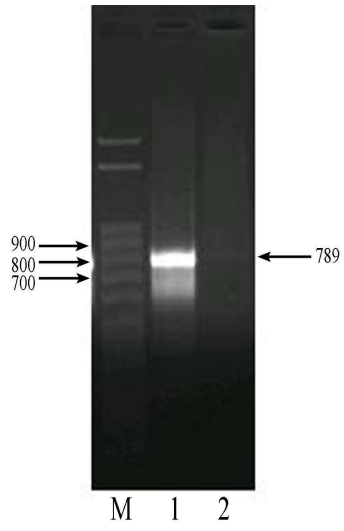
Çizelge 2.2 PCR ürün uzunluğu, restriksiyon enzimi kesim bölgeleri, normal ve homozigot bireylerde kesimden sonra elde edilen fragmanların uzunluğu.

Mutasyon	PCR ürünü uzunluğu	Restriksiyon enzimi/ Tanıma bölgesi	kesimden sonra elde edilen fragmanların uzunluğu	
			Normal	Homozigot Mutant
8 bp delesyon	64 bp	-----	64	56
Büyük delesyon	789 bp	-----	789	-----
P30L	854 bp	Aci I/ C ↓ C G C	464, 167, 153, 43, 27	464, 196, 167, 27
IVS2	126 bp	Alu I/ AG ↓ CT	60, 51, 15	60, 34, 17, 15
I172N	330 bp	BseI I/ ACTG G N ↓	231, 95	217, 95, 14
E6 Cluster	1460 bp	Mbo I/ ↓ GATC	349, 336, 332, 257, 183	685, 332, 257, 183
V281L	1460 bp	Alw21 I/ GTGCT ↓ C A A	991, 205, 170, 91	1165, 205, 91
Q318X	1460 bp	Pst I/ CTGCA ↓ G	584, 300, 298, 154, 121	584, 452, 300, 121
R356W	1460 bp	Aci I/ C ↓ CG C	420, 272, 189, 166, 131, 65, 56, 55, 34, 30, 12, 10, 9, 8	420, 272, 218, 166, 131, 65, 56, 55, 34, 12, 10, 9, 8

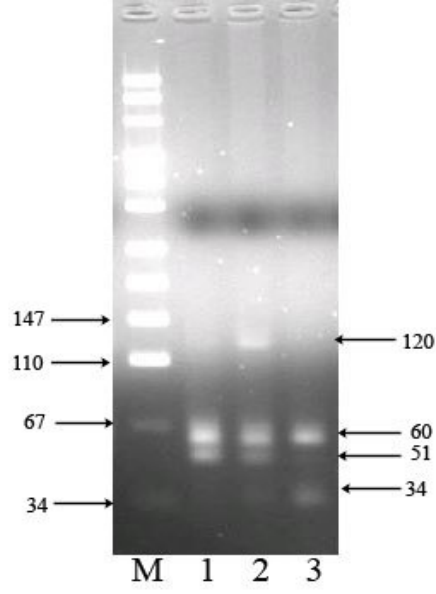
Şekil (2.2), (2.3), (2.4), (2.5), (2.6), (2.7), (2.8), (2.9) ve (2.10)'da çalışılan her bir mutasyon için RFLP kesimlerinin jel görüntüleri verilmiştir.



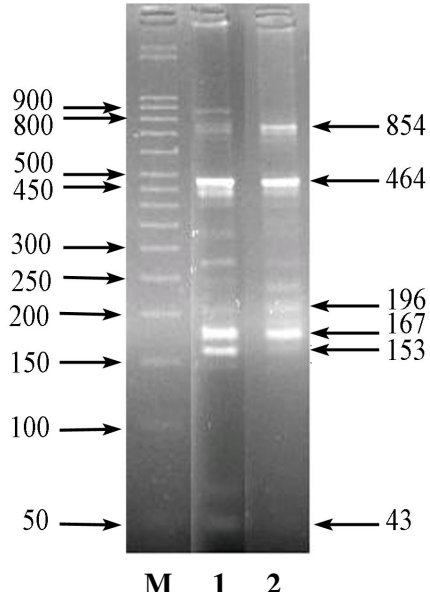
Şekil 2.2. 8bp'lik mutasyonunun jel görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; mutant.



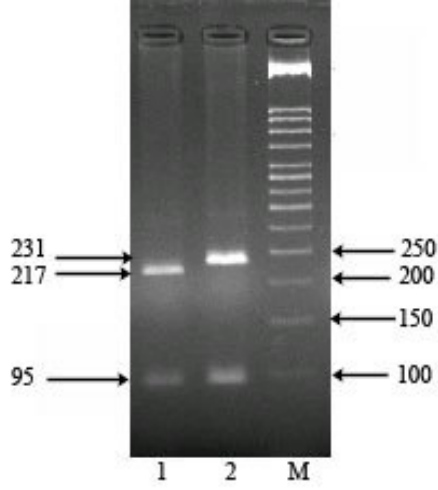
Şekil 2.3. BD mutasyonunun jel görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; mutant.



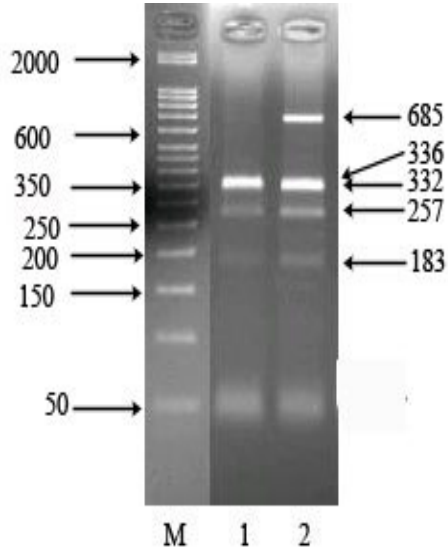
Şekil 2.4. IVS2 mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; heterozigot mutant, 3; homozigot mutant.



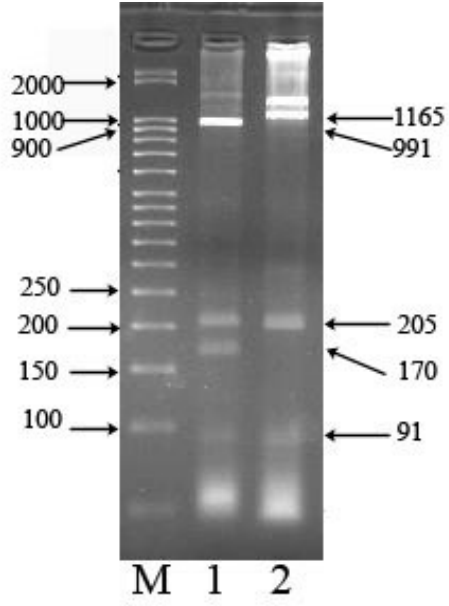
Şekil 2.5. P30L mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; homozigot mutant.



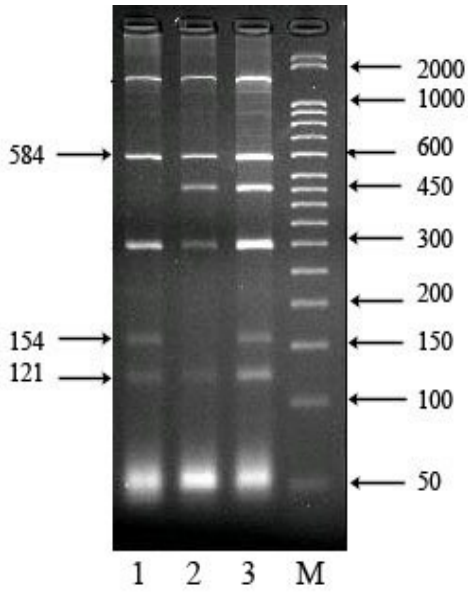
Şekil 2.6. I172N mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; homozigot mutant, 2; normal.



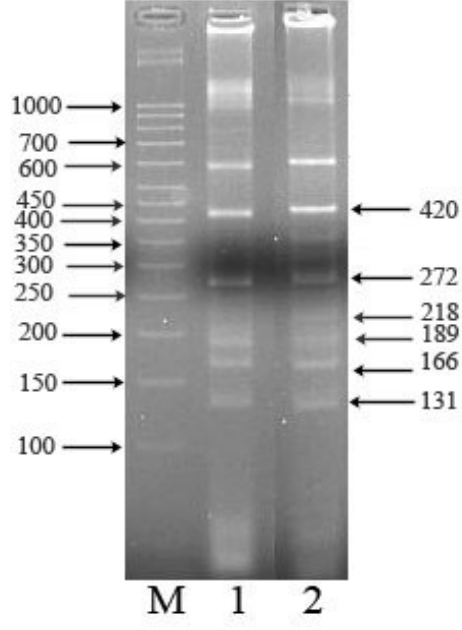
Şekil 2.7. E6 Cluster mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; heterozigot mutant.



Şekil 2.8. V281L mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; homozigot mutant.



Şekil 2.9. Q318X mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; homozigot mutant, 3; heterozigot mutant.



Şekil 2.10. R356W mutasyonunun, enzimle kesilen ürünlerin jelde yürütüldükten sonraki görüntüsü. M; marker, 1; normal, 2; homozigot mutant.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden gelen hastalar çalışılmıştır. Hastaların %30'ü Ankara'dan, %6'sı Çankırı'dan, %6'sı Çorum'dan, %6'sı Gaziantep'ten olup, geri kalan %52'si, Marmara bölgesi hariç, toplam 6 coğrafik bölgeye ait diğer 27 ilden olan hastalar oluşturmaktadır.

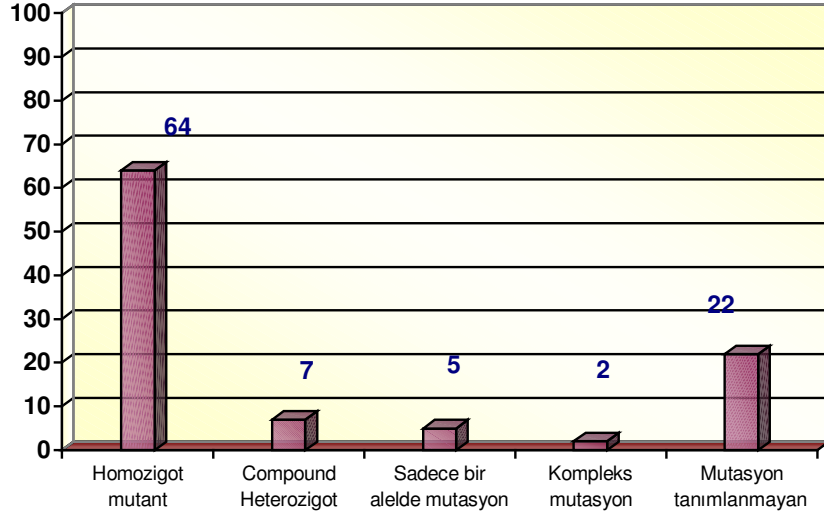
Çalışılan 100 hastadan, 78'inde (%78) ve 200 aleden, 155'inde (%77.5) mutasyon saptanmıştır. Klasik tuz kaybettiren formlu 50 hastanın hepsinde (%100) mutasyon saptanırken klasik basit virilizan formlu 50 hastadan ancak 28'inde (%56) mutasyon tanımlanabilmiştir. Hastalarda bulunan mutasyonlar çizelge 3.1'de verilmiştir.

Hastaların 64'ü (%64) aynı mutasyon için homozigot, 7'si (%7) iki farklı mutasyon için "compound" heterozigot olarak saptanmıştır (şekil 3.1). Hastalardan 5'inde (%5), alellerin sadece birinde mutasyon saptanmıştır ve diğer alelde mutasyon saptanmamıştır. Ayrıca 2 hastada (%2) her bir alelde birden fazla mutasyon saptanmıştır. Birinci hasta (76. sıra ile gösterilen hasta) hem 8bp'lik delesyon hem de V281L mutasyonları için homozigot olarak saptanırken, diğer hasta (92. sıra ile gösterilen hasta) hem Q318X mutasyonu için hem de R356W mutasyonu için homozigot olarak saptanmıştır.

Hastaların %56'sı kız ve %44'ü erkektir. Hastaların tanı yaşı 1 günlük ve 12 yaş arasında değişmektedir. Tuz kaybettiren tip için tanı yaşı 1 günlük ve 3.7 yaş arasında iken basit virilizan tipi tanı yaşı 1 günlük ve 12 yaş arasında değişmektedir. Tuz kaybettiren form daha ağır klinik tabloya yol açtığından, bu tip hastalarda daha küçük yaşlarda tanı konulabilirken basit virilizan formu daha büyük yaşlarda tanı alabilmektedir.

Toplam 100 hastadan 56'sında anne-baba akrabalığı söz konusudur. Bu hastaların 42'sinde (%75) mutasyon saptanmıştır. Mutasyon saptanan 42 hastadan

37'si (%88) homozigot mutant, 3'ü (%6.3) "Compound" heterozigot olarak saptanmıştır. Bir hastada (%2.3) sadece alellerin birinde mutasyon saptanmıştır. Bir hastada (%2.3) da her bir alelde birden fazla mutasyon saptanmıştır (Q318X/ Q318X ve R356W/ R356W).



Şekil 3.1. Saptanan mutasyonların tiplerine göre sıklıkları

Çizelge 3.1. 21-OHD saptanan 100 hastanın tanı yaşı, akraba evliliği, aile öyküsü, doğum yeri, klinik tanısı ve CYP21 gen mutasyonları

Sıra	Cinsiyet	Klinik tip	Mutasyon	Tanı yaşı	Akraba evliliği	Aile öyküsü	Doğum yeri
1	K	TK	BD/ BD	5 GÜN.	YOK	YOK	TRABZON
2	K	BV	-----	10.6 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
3	K	TK	Q318X/ Q318X	13 GÜN.	VAR	YOK	GAZİANTEP
4	E	TK	IVS2/ IVS2	2.5 YAŞ	VAR	YOK	URFA
5	K	TK	8bp/ 8bp	1 GÜN.	YOK	YOK	DENİZLİ
6	K	BV	IVS2/ IVS2	3 AY.	YOK	VAR	K. MARAŞ
7	E	BV	IVS2/ IVS2	6 YAŞ	VAR	VAR	ANKARA
8	E	TK	IVS2/ IVS2	1 AY.	VAR	YOK	ANKARA
9	K	BV	V281L/ V281L	20 GÜN.	YOK	YOK	ANKARA
10	E	BV	Q318X/ R356W	3.0 YAŞ	VAR	YOK	MALATYA
11	K	BV	IVS2/ IVS2	1.5 YAŞ	VAR	YOK	ELAZIĞ
12	E	TK	IVS2/ IVS2	15 GÜN.	YOK	YOK	ANKARA
13	K	TK	BD/ BD	1 GÜN.	VAR	YOK	ÇANKIRI
14	E	TK	IVS2/ IVS2	4 AY.	YOK	YOK	ANKARA
15	E	TK	BD/ BD	2 AY	VAR	YOK	AFYON
16	K	BV	IVS2/ Q318X	10 GÜN	YOK	YOK	ANKARA
17	E	BV	-----	1 AY.	YOK	YOK	ÇORUM
18	E	TK	IVS2/ IVS2	1.5 AY	YOK	YOK	ANKARA
19	E	BV	IVS2/ IVS2	5 YAŞ	YOK	YOK	ÇANKIRI
20	E	BV	IVS2/ IVS2	1 AY	VAR	YOK	ANKARA
21	E	TK	8bp/ 8bp	1 AY	VAR	YOK	YOZGAT
22	K	TK	IVS2/ IVS2	1 GÜN.	YOK	VAR	ANKARA
23	E	TK	IVS2/ IVS2	1 GÜN.	VAR	VAR	URFA
24	K	BV	-----	8 YAŞ	YOK	YOK	ELAZIĞ
25	K	BV	I172N/ I172N	3.7 YAŞ	VAR	YOK	ÇORUM
26	K	TK	R356W/ R356W	1 GÜN.	VAR	VAR	YOZGAT
27	K	BV	IVS2/ IVS2	5AY	YOK	YOK	GÜMÜŞHANE
28	K	BV	-----	1 GÜN.	YOK	YOK	DENİZLİ
29	K	BV	BD/ BD	10 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
30	E	TK	BD/ BD	1AY	YOK	VAR	ANKARA
31	K	BV	I172N/ I172N	2 YAŞ	VAR	VAR	ANKARA

Sıra	Cinsiyet	Klinik tip	Mutasyon	Tanı yaşı	Akraba evliliği	Aile öyküsü	Doğum yeri
32	K	BV	-----	1 GÜN.	YOK	YOK	AKSARAY
33	E	TK	Q318X/ Q318X	25 GÜN.	YOK	YOK	ADANA
34	K	TK	BD/ BD	20 GÜN.	VAR	VAR	GAZİANTEP
35	K	TK	Q318X/ R356W	3 GÜN.	VAR	YOK	ÇANKIRI
36	E	BV	I172N/ ?	4 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
37	K	BV	-----	7 GÜN.	VAR	YOK	ÇORUM
38	E	TK	Q318X/ Q318X	2 AY.	YOK	YOK	ÇORUM
39	E	BV	I172N/ Q318X	5.2 YAŞ	VAR	YOK	ÇANKIRI
40	E	TK	BD/ BD	1 GÜN.	VAR	YOK	TUNCELİ
41	E	TK	Q318X/ Q318X	10 GÜN	VAR	YOK	ÇANKIRI
42	E	TK	IVS2/ IVS2	2 YAŞ	VAR	YOK	GAZİANTEP
43	K	TK	BD/ BD	20 GÜN	VAR	VAR	KUTAHYA
44	K	BV	-----	1 YAŞ	VAR	YOK	ANKARA
45	K	BV	IVS2/ IVS2	4 GÜN.	YOK	VAR	TRABZON
46	K	BV	IVS2/ IVS2	3.3 YAŞ	VAR	YOK	GİRESUN
47	E	TK	IVS2/ IVS2	4 AY.	VAR	YOK	GAZİANTEP
48	E	BV	-----	7 YAŞ	VAR	YOK	KONYA
49	K	TK	BD/ BD	1 GÜN.	VAR	YOK	AMASYA
50	K	BV	-----	10 YAŞ	VAR	YOK	ANKARA
51	K	TK	IVS2/ IVS2	1 GÜN.	YOK	YOK	ANKARA
52	K	TK	Q318X/ Q318X	2 AY.	VAR	VAR	AKSARAY
53	E	TK	IVS2/ IVS2	1.5 AY.	VAR	VAR	ANKARA
54	E	BV	-----	2 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
55	E	BV	P30L/ IVS2	1 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
56	E	TK	IVS2/ IVS2	4 AY.	VAR	YOK	ANKARA
57	K	BV	IVS2/ IVS2	2 GÜN.	YOK	YOK	ERZİNCAN
58	K	TK	BD/ BD	3 GÜN	YOK	YOK	KARS
59	E	BV	IVS2/ IVS2	6 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
60	K	BV	-----	2 AY.	VAR	YOK	ZONGULDAK
61	K	BV	-----	1.1 YAŞ	VAR	YOK	BOLU
62	K	TK	BD/ BD	2.5 AY.	VAR	VAR	K. MARAŞ
63	K	BV	-----	6 AY.	VAR	VAR	ÇANKIRI
64	K	TK	Q318X/ Q318X	1 GÜN.	VAR	VAR	ANKARA

Sıra	Cinsiyet	Klinik tip	Mutasyon	Tanı yaşı	Akraba evliliği	Aile öyküsü	Doğum yeri
65	K	BV	-----	7.8 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
66	K	BV	IVS2/ IVS2	2 AY.	YOK	YOK	ERZURUM
67	K	BV	-----	1.3 YAŞ	YOK	YOK	ANKARA
68	E	TK	Q318X/ Q318X	3 AY.	VAR	YOK	ANKARA
69	E	BV	E6/ ?	5 YAŞ	YOK	YOK	KÜTAHYA
70	K	BV	-----	7 YAŞ	VAR	YOK	ANKARA
71	E	TK	BD/ BD	1 AY.	YOK	YOK	BOLU
72	K	TK	BD/ BD	7 GÜN.	VAR	VAR	HATAY
73	E	BV	P30L/ P30L	6 YAŞ	YOK	VAR	TUNCELİ
74	K	BV	-----	7.5 YAŞ	VAR	YOK	YOZGAT
75	E	BV	-----	1 YAŞ	VAR	YOK	SİVAS
76	K	TK	V281L/ V281L 8bp/ 8bp	2 YAŞ	YOK	YOK	MUŞ
77	K	BV	-----	14 GÜN.	VAR	YOK	YOZGAT
78	E	BV	-----	4.7 YAŞ	VAR	YOK	URFA
79	K	BV	V281L/ V281L	2 AY.	YOK	YOK	ZONGULDAK
80	K	TK	8bp/ 8bp	1.5 AY.	VAR	YOK	ÇORUM
81	E	BV	E6/ V281L	2 AY.	YOK	YOK	URFA
82	K	BV	I172N/ I172N	6 YAŞ	YOK	YOK	AFYON
83	K	BV	BD/ BD	12 YAŞ	VAR	YOK	SİVAS
84	K	TK	Q318X/ R356W	1 AY.	YOK	YOK	ANKARA
85	E	TK	BD/ BD	1 AY.	VAR	YOK	KONYA
86	E	BV	R356W/ ?	1 GÜN.	YOK	YOK	AKSARAY
87	K	BV	V281L/ V281L	5.9 YAŞ	VAR	YOK	AKSARAY
88	K	TK	IVS2/ IVS2	3 GÜN.	VAR	YOK	YOZGAT
89	E	TK	IVS2/ ?	7 AY.	YOK	YOK	KIRŞEHİR
90	E	TK	IVS2/ IVS2	3.7 YAŞ	VAR	YOK	TRABZON
91	K	TK	IVS2/ IVS2	1 AY.	VAR	YOK	GAZİANTEP
92	E	TK	Q318X/ Q318X R356W/ R356W	3 AY.	VAR	VAR	ZONGULDAK
93	E	TK	BD/ BD	1.5 AY.	VAR	YOK	ÇORUM
94	K	TK	Q318X/ Q318X	1 GÜN.	YOK	YOK	SİNOP
95	K	TK	Q318X/ Q318X	1.5 AY	VAR	YOK	ANKARA
96	E	TK	IVS2/ IVS2	6 AY.	YOK	YOK	SİVAS
97	K	TK	R356W/ ?	7 GÜN	VAR	YOK	ANKARA

Sıra	Cinsiyet	Klinik tip	Mutasyon	Tanı yaşı	Akraba evliliği	Aile öyküsü	Doğum yeri
98	E	BV	-----	4 YAŞ	VAR	YOK	KIRŞEHİR
99	E	TK	BD/ BD	21 GÜN	YOK	YOK	İSPARTA
100	K	BV	-----	9 YAŞ	VAR	YOK	GAZİANTEP

TK: TUZ KAYBETTİREN

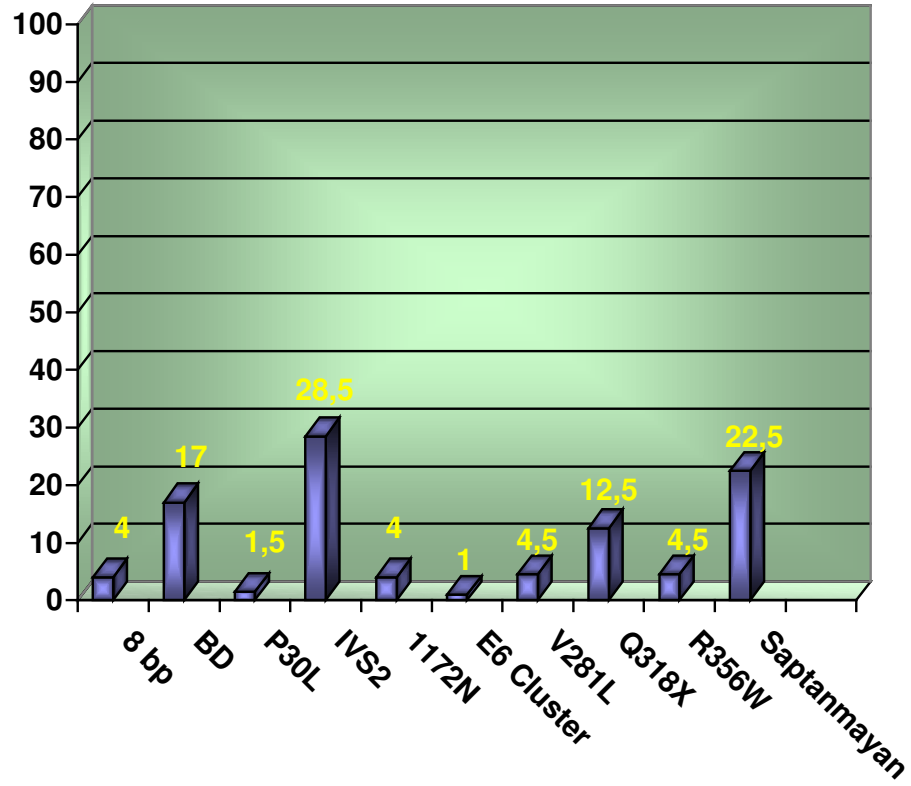
BV: BASİT VİRİLİZAN

Hastaların 18'inde (%18) aile öyküsü söz konusu iken 82'sinde (%82) söz konusu değildir. Aile öyküsü olan 18 hastadan 13'ünde (%72.2) anne-baba akrabalığı vardır; 11'i (%84.6) homozigot mutasyona, biri (%7.9) her bir alelde birden fazla mutasyona sahiptir. Bir hastada (%7.9) mutasyon saptanmamıştır.

En sık saptanan mutasyon IVS2 olup, alel sıklığı %28.5 olarak saptanmıştır. Çizelge 3.2'de 100 hastada saptanan total mutasyon sıklığı ve her bir klinik tipe ait mutasyon sıklığı ve Şekil 3.2'de CYP21 geninde en sık rastlanan ve çalışılan 9 mutasyonun alel sıklıkları verilmiştir.

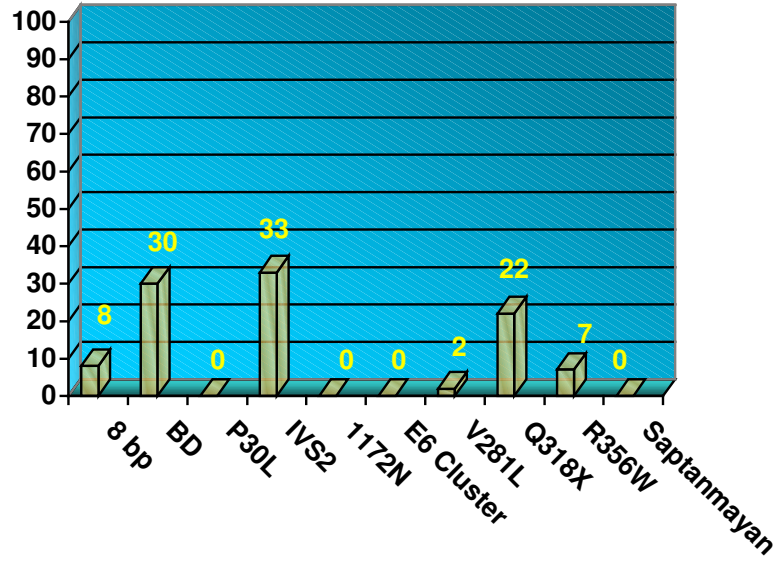
Çizelge 3.2. 21-OHD'li 100 Türk hastada saptanan mutasyonların sıklığı.

Mutasyon	Allel sayısı n=200	TK formda alel (100) sıklığı (%)	BV formda alel (100) sıklığı (%)	Total mutasyon sıklığı (%)
8 bp	8	8	0	4
Büyük delesyon	34	30	4	17
P30L	3	0	3	1.5
IVS2	57	33	24	28.5
I172N	8	0	8	4
E6 Cluster	2	0	2	1
V281L	9	2	7	4.5
Q318X	25	22	3	12.5
R356W	9	7	2	4.5
Saptanmayan	49	0	49	22.5

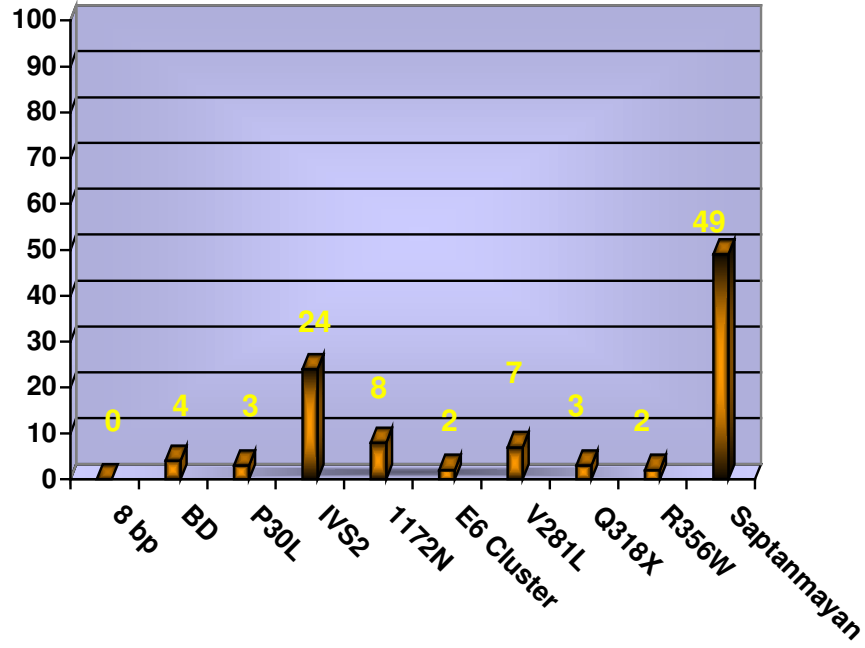


Şekil 3.2 Çalışılan 100 hastada CYP21 geninde en sık rastlanan ve çalışılan 9 mutasyonun allel sıklıkları.

Hem tuz kaybettiren formda hem de basit virilizan formda en sık saptanan mutasyon IVS2 mutasyonu olup allel sıklığı her bir form için sırayla %33 ve %24 olarak saptanmıştır. Tuz kaybettiren formda ve basit virilizan formda saptanan allel sıklıkları şekil 3.3 ve şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.3 Tuz kaybettiren formu 50 KAH hastasında CYP21 geninde en sık rastlanan 9 mutasyonun alel sıklıkları.



Şekil 3.4 Basit virilizan formu 50 KAH hastasında CYP21 geninde en sık rastlanan 9 mutasyonun alel sıklıkları.

4. TARTIŞMA

21-hidroksilaz defekti, konjenital adrenal hiperplaziye neden olan enzim defektleri içinde en sık (>%90) görülendir. Enzimi kodlayan CYP21 geni polimorfik genlerden olmakla birlikte hastalığa yaklaşık 70 farklı mutasyon yol açmaktadır. Mutasyon sıklığının ve farklılıklarının yüksek olması, bu genle %98 homoloji gösteren CYP21P psödogeninin varlığına bağlanmaktadır. Bu yüksek homoloji mayozda eşit olmayan krosing over sonucu delesyon veya duplikasyonlara (%20) ya da mitoz sırasında psödogende var olan nükleotid değişimlerinin CYP21 genine transfer olmasına (%75) neden olur. Oluşan geniş ya da küçük gen dönüşümleri genin işlevsiz ya da işlevi az olan protein ürünleri vermesine ya da protein ürününün olmamasına yol açmaktadır. Taze mutasyon hastaların %1'inde saptanmaktadır (Speiser ve ark., 1992; New ve Betensky, 2004).

Moleküler çalışmalarda hasta ve taşıyıcı bireylerin %90-95'inde büyük delesyonlar, 8bp'lik delesyon, P30L, IVS2, I172N, E6 Cluster, V281L, Q318X ve R356W mutasyonları en sık rastlanan 9 mutasyonu oluşturmaktadır. Ancak farklı toplumlarda bu mutasyonların sıklıklarının değiştiği ve her populasyon çalışmasında farklı mutasyonların da tanımlandığı bildirilmektedir.

4.1 Alel Sıklığı ve Dağılımı

21-OHD'inde dünyada en sık rastlanan mutasyon IVS2 mutasyonudur (New ve Betensky, 2004). Bu çalışmada da IVS2 mutasyonu, %28.5 alel sıklığı ile saptanan en sık mutasyon olmuştur. Mutasyonların yarısından çoğunu (%58) IVS2, büyük delesyonlar ve Q318X mutasyonları oluştururken 8bp delesyonu, P30L, I172N, E6 Cluster, V281L ve R356W %19.5'ünü oluşturmaktadır. CYP21 gen mutasyonlarının daha önce bildirilen alel sıklıkları çizelge 4.1'de verilmiştir. Mutasyon saptanmayan hastaların hepsi basit virilizan tip olarak tanı alan hastalardır. Tuz kaybettiren formu hastaların tümünde mutasyon saptanmıştır

Çizelge 4.1. Bazı ülkelerde CYP21 gen mutasyonlarının alel sıklığı (%) dağılımı (Koyama ve ark., 2002'den alınmıştır).

ÜLKE	ALLEL SAYISI	8bp del.	BD	P30L	IVS2	I172N	E6	V281L	Q318X	R356W
JAPONYA	46		2.1		37.0	23.9			19.6	6.5
İSVEÇ	186	1.2	29.8	1.6	27.7	20.8	0.5	5.4	0.5	3.8
İSPANYA	76	3.9	11.8	2.6	25	1.3	0	18.4	3.9	3.9
AMERİKA	394	2.8	22.6	2.5	26.9	8.4	0	8.9	4.1	3.8
TÜRKİYE (Tukel, 2003)	62	3.2	9.6	0	22.5	11.4	3.2	0	8	9.6
Bu Çalışmada	200	4	17	1.5	28.5	4	1	4.5	12.5	4.5

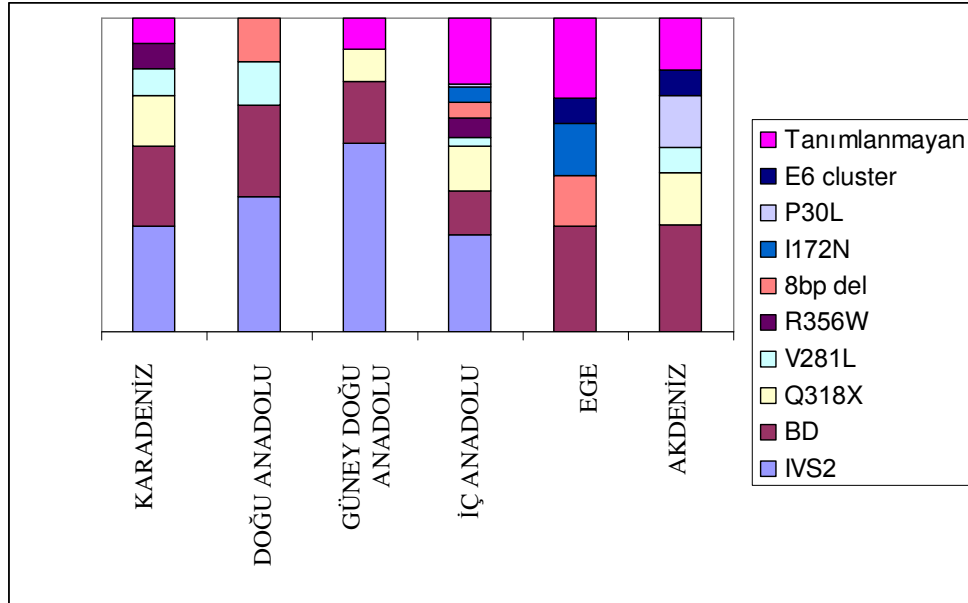
Tukel ve ark., (2003) tarafından Southern blot, Allel-specific PCR ve Semiquantitative PCR yöntemleri kullanılarak 31 hastada yapılan çalışmada da, IVS2 mutasyonunun Türkiye’de en sık mutasyon olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızın sonuçları bu bulguyu desteklemektedir. Ayrıca Japonya, İspanya, Amerika gibi bazı ülkelerde de IVS2 en sık saptanan mutasyon olarak bildirilmektedir. İsveç’de ise büyük gen delesyonlarının en sık KAH’a yol açtığı rapor edilmektedir.

Tukel ve ark., (2003) yaptığı çalışmada P30L ve V281L mutasyonları saptanmamıştır, ama bu çalışma bu mutasyonların da Türkiye’de sırası ile %1.5 ve %4.5 sıklıkla görüldüğünü ortaya koymuştur.

Q318X mutasyonunun %12.5 sıklıkla saptanması ve Japonya gibi (%19.5) en sık saptanan üçüncü mutasyon olması da Türk toplumunun bir diğer özelliği sayılabilir. Tukel ve arkadaşlarının (2003) bulguları da bunu desteklemektedir.

Farklı toplumlarda, toplumlar arasındaki farklılıkların yanısıra, farklı alel sıklıklarının saptanması seçilen hasta grupları arasındaki farklılıklardan kaynaklanabilir. Tükel ve arkadaşlarının (2003) yaptığı çalışmada hastaların %54.8'i tuz kaybettiren formda, %38.8'i basit virilizan formda ve %6.4'ü klasik olmayan formda izlenen hastalardan oluşmuştur. Ayrıca İspanya'da yapılan bir çalışmada 76 alelden 42'si tuz kaybettiren formda, 4'ü basit virilizan formda ve 30'ü klasik olmayan formda izlenen hastalardan oluşmuştur. Bu çalışmada ise klasik olmayan formda hasta çalışılmamıştır (Koyama ve ark., 2002).

Alellerin Türkiye içindeki dağılımına bakıldığında, büyük gen delesyonlarının her bölgede önemli yer tuttuğu gözlenmektedir. Ege ve Akdeniz bölgesinde dünyada ve ülkemizde en sık görülen mutasyon olan IVS2 mutasyonuna rastlanmaması dikkat çekicidir. Benzer şekilde E6 cluster mutasyonu da yalnızca bu iki bölgemizden gelen hastalarda saptanmıştır. Akdeniz bölgesi de P30L mutasyonlarının saptandığı tek bölge olarak göze çarpmaktadır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Alellerin Türkiye'de bölgelere göre dağılımı.

4.2 Genotip-Fenotip İlişkisi

Genotip-fenotip ilişkisi açısından ağır klinik tabloya yol açan 8bp'lik delesyon (Krone ve ark., 2000) sadece tuz kaybettiren forma sahip hastalarda saptanmıştır ve tuz kaybettiren formda alel sıklığı %8 iken, basit virilizan formda %0 dır.

Ağır klinik tabloya yol açan büyük delesyonların (Krone ve ark., 2000) tuz kaybettiren formda alel sıklığı %30 iken, basit virilizan formda %4 tür.

Hafif klinik tabloya yol açan P30L mutasyonu (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) fenotip ile uyumlu olarak sadece basit virilizan formda (%3) saptanmıştır ve tuz kaybettiren formda (%0) saptanmamıştır.

I172N mutasyonu da fenotip ile uyumlu olarak (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) sadece basit virilizan formda (%8) saptanmıştır ve tuz kaybettiren formda (%0) saptanmamıştır.

Ağır mutasyon olarak tanımlanan E6 Cluster mutasyonu (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) sadece iki hastada saptanmıştır. Hastaların birinde alellerin birisinde E6 Cluster mutasyonu ve diğer alelde V281L mutasyonu saptanmıştır. Hafif mutasyon olarak tanımlanan V281L ile “compound” heterozigot olan bu hastanın basit virilizan forma sahip olması bu hafif alel ile birlikteliği ile açıklanabilir. Yine basit virilizan formda olan ikinci hastada ise diğer alelde mutasyon saptanmamıştır.

Hafif mutasyon olarak tanımlanan V281L mutasyonu, (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) alellerin %7'sinde fenotip ile uyumlu olarak basit virilizan formda saptanmıştır. Tuz kaybettiren formda olan bir hastanın her iki alelinde de V281L yanı sıra 8bp'lik delesyon saptanmıştır. Bu hastada tuz kaybettiren formda klinik bulguların varlığı 8bp'lik delesyon ile açıklanabilir.

Ağır mutasyon olarak tanımlanan Q318X mutasyonu (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) %22 sıklıkla tuz kaybettiren formda ve %3 sıklıkla basit virilizan formda saptanmıştır. Basit virilizan formda olan bu 3 alelden birisi IVS2 ile, ikincisi I172N ile ve üçüncüsü R356W mutasyonu ile “ compound” heterozigot olarak saptanmıştır.

Ağır mutasyon olarak tanımlanan R356W mutasyonu (Krone ve ark., 2000, Grumbach ve ark., 2003) %7 sıklıkla tuz kaybettiren formda ve %2 sıklıkla basit virilizan formda saptanmıştır. Basit virilizan formda olan bu 2 alelden birisi Q318X mutasyonu ile “Compound” heterozigot olan ve diğer hasta sadece bir alelinde mutasyon saptanan hastalardır.

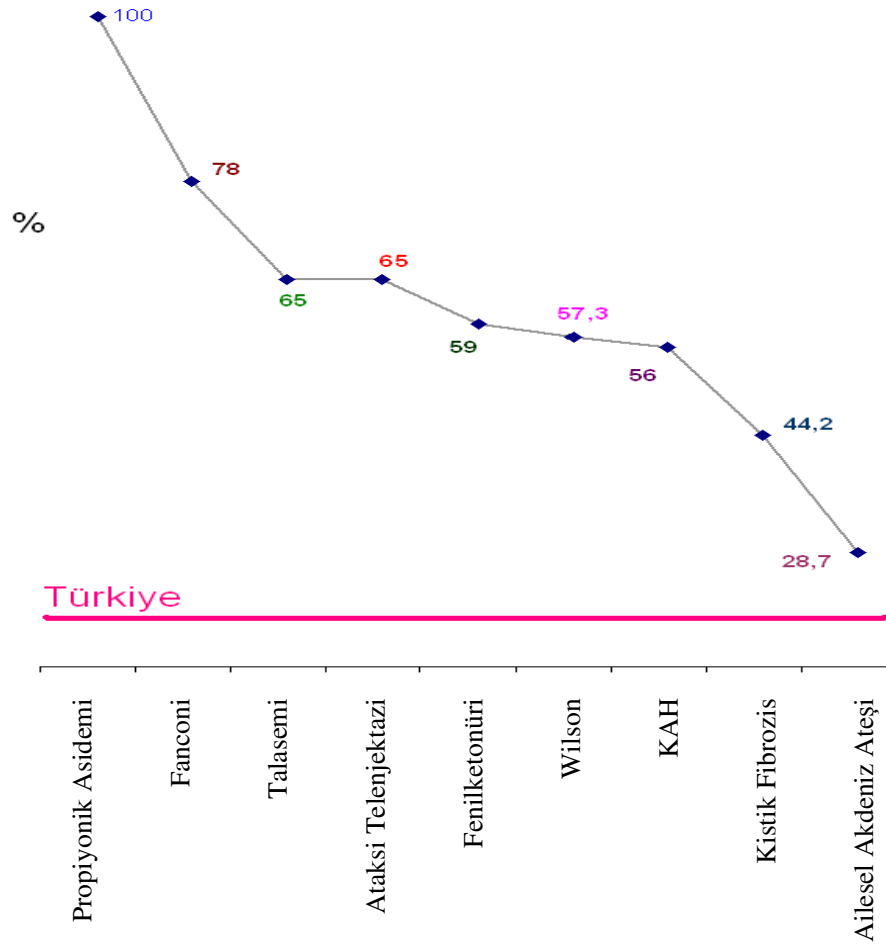
İki hasta her bir alelde birden fazla mutasyon taşımaktadır. Hastaların birisi hem 8bp’lik delesyon hem de V281L mutasyonları için homozigot olarak saptanırken, diğer hasta hem Q318X mutasyonu için hem de R356W mutasyonu için homozigot olarak saptanmıştır. Bu durum gen dönüşümü ile açıklanabilir.

4.3 “Compound” Heterozigotluk ve Akraba Evliliği

Bu çalışmada “compound” heterozigot olarak saptanan hasta sayısı diğer çalışmalardan daha azdır (%7). Halbuki Tukul ve ark., (2003) yaptığı çalışmada hastaların %35.4’ü “compound” heterozigot olarak saptanmıştır. Tunus’da Kharrat ve ark., (2004) tarafından yapılan çalışmada “compound” heterozigotluk oranı %17.6 iken Koyama ve ark., (2002) tarafından Japonya’da yapılan bir çalışmada %87.8 saptanmıştır. Türkiye’de akraba evliliğinin yüksek olması homozigot mutantların sayısının “compound ” heterozigotlardan fazla olmasını açıklayabilir.

Bu 7 hastanın 3’ünde (%42.8) anne-baba akrabalığı vardır. “Compound” heterozigot bireylerde akraba evliliğinin bu kadar yüksek olması toplumumuzda CYP21 gen mutasyonlarının sıklığının yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Otozomal resesif hastalıklarda toplumda ender görülen hastalıklar için akraba evliliği oranları yüksek ve sık görülenler için düşük olarak beklenmektedir. Şekil 4.2’de bazı otozomal resesif hastalıklar için ülkemizdeki ebeveyn akrabalığı sıklığı gösterilmiştir (Tokatlı ve ark., 1993, Altay ve ark., 1997, Saltık ve ark., 2000, Altay ve ark., 1995, Ersoy ve ark., 1991, Coşkun ve ark., 1993, Yüce ve ark., 2000, Göçmen ve ark., 1995, Saatçi ve ark., 1997). Burada da görüleceği gibi, ülkemizde sık olduğunu bildiğimiz Fenilketonüri için akrabalık oranları bizim çalışmamızdan elde etmiş olduğumuz KAH’lı çocukların ebeveyn akrabalığı (%56) sıklığından daha yüksek görülmektedir. Daha önce %56.4 olarak bildirilmiş (Kandemir ve Yordam, 1997) olan bu sıklık bizim çalışmamız ile uyumlu görünmektedir. Bu sonuçlar CYP21 gen mutasyonlarının sıklığının ülkemizde yüksek olabileceği öngörüsünü desteklemektedir.



Şekil 4.2 Türkiye’de bazı otozomal resesif hastalıklar için ebeveyn akrabalığı sıklıkları.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma Türkiye'nin farklı 31 ilinden olan hastalar üzerinde olan bir çalışma olması ile birlikte hasta sayısı da dikkate alınırca CYP21 gen mutasyonlarının sıklığını Türkiye'de temsil edebilmektedir.

Kullanılan yöntem çeşitli mutasyonları saptayabildiğinden güvenilir bir yöntem olup ekonomik açıdandan da rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntemdir.

Dünya literatüründe hastaların %95'inde gözlenen mutasyonlar ülkemizde %78 sıklığında gözlenmiştir. Bu da ülkemizde dünyada ender görülen mutasyonların daha sık olabileceğini ya da toplumumuza özgü yaygın mutasyonların varlığını düşündürmektedir.

En sık saptanan mutasyon IVS2 olup, alel sıklığı %28.5 olarak saptanmıştır. Diğer mutasyonların alel sıklıkları 8bp'lik delesyon; %4, BD; %17, P30L; %1.5, I172N; %4, E6 Cluster; %1, V281L; %4.5, Q318X; %12.5, R356W; %4.5 olarak saptanmıştır. Daha önce bildirilen literatüre uygun genotip-fenotip ilişkisi toplumumuzda da kurulabilmektedir.

Akraba evliliğinin sık olduğu ülkemizde, çalışılan 100 hasta bireyin ancak 56'sında anne-baba akrabalığı söz konusudur. "Compound" heterozigotlarda akraba evliliği oranı %37.5 olarak saptanmıştır. Bu iki sonuç birlikte değerlendirildiğinde ülkemizde mutant CYP21 alel sıklığının yüksek olduğu öngörülebilir.

Mutasyon tanımlanmayan hastalarda DNA dizi analizi yapılması ile ender ya da toplumumuza özgü mutasyonların tanımlanması mümkün olacaktır.

ÖZET

Türkiye’de 21-OHD Hastalarında CYP21 Geninde En Sık Rastlanan 9 Mutasyonun Sıklıklarının Saptanması

21 hidroksilaz defekti otozomal resesif olarak kalıtılan ve CYP21 geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Türkiye’de CYP21 gen mutasyonlarının sıklıklarını saptamak için aynı aileden olmayan 100 klasik formlu hastada mutasyon çalışması, PCR ve RFLP yöntemleri ile yapılmıştır. Hastaların %78’inde (alel frekansı: %77.5) mutasyon saptanmıştır. En sık saptanan mutasyon IVS2 mutasyonu olup alel frekansı %28.5 olarak saptanmıştır. Diğer mutasyonların alel frekansı: 8bp; %4, BD; %17, P30L; %1.5, I172N; %4, E6 Cluster; %1, V281L; %4.5, Q318X; %12.5, R356W; %4.5.

Anahtar Sözcükler: CYP21 gen, Konjenital adrenal hiperplazi, Mutasyon, Türkiye, 21-OHD.

SUMMARY

Identification of Frequency and Distribution of the 9 Most Frequently Mutations in Turkish Patients with 21-OHD.

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a group of autosomal recessive disorders mainly due to defects in the steroid 21- hydroxylase (CYP21) gene. To determine the mutational spectrum in the Turkish population, the CYP21 active gene was analyzed in 100 unrelated patients using PCR and RFLP. All patients had a classical form of 21-hydroxylase deficiency. Mutations were detected in 78 patients (allele frequencies; %77.5). The most frequent mutation in the Turkish CAH population was found to be IVS2, with %28.5 allele frequency. The allele frequencies of the other mutations were as follows: 8bp; %4, BD; %17, P30L; %1.5, I172N; %4, E6 Cluster; %1, V281L; %4.5, Q318X; %12.5, R356W; %4.5.

Key Words: Congenital adrenal hyperplasia, CYP21 gene, Mutation, Turkish, 21-OHD.

KAYNAKLAR

- Altay C, Alikashiöglu M, Kara A, et al. Analysis of 65 Turkish patients with congenital aplasti anemia (Fanconi anemia and non- Fanconi anemia): Hacettepe experience. *Clin Genet* 1997; 51: 296-302.
- Altay C, başak N. Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey. *Int Pediatr Hem Oncol* 1995; 2: 283-290.
- Collett-Solberg PF. (2001). Congenital Adrenal Hyperplasia: From Genetics and Biochemistry to Clinical Practice, Part 2 *Clin Pediatr*; 40:125-132.
- Coşkun T, Özgüç M, Tokatlı A, et al. Phenylketonuria in Turkey: epidemiological, clinical and genetic aspects. *Dev Brain Dysfunc* 1993; 6: 134-140.
- Ersoy F, Berkel I, Sanal Ö, et al. Twenty-year follow up of 160 patients with ataxia telangiectasia. *Turk J Pediatr* 1991; 33: 205-215.
- Day DJ, Speiser PW, Schulze E, Bettendorf M, Fitness J, Barany F and White PC (1996). 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*, 5:2039-48.
- Deaton MA, Glorioso JE and Mclean DB. (1999). Congenital Adrenal Hyperplasia: Not Really a Zerbera. *American Family Physician*.
- Deneuve C, Tardy V, Dib A, Mornet E, Billaud L, Charron D, Morel Y and Kuttent F. (2001). Phenotype- Genotype Correlation in 56 Women With Nonclassical Congenital adrenal Hyperplasia due to 21-hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol & Metab*, 86: 207-213.
- Frindik JP. (2003). 3-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency. www.eMedicine.com, Inc.
- Gotoh H, Kusakabe M, Shiroshi T, Moriwaki K. (1994). Survival of steroid 21-hydroxylase- deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis a model system for treatment of congenital adrenal hyperplasia in humans *Endocrinol*, 135:1470-1476.
- Göçmen A, Özçelik U, Kiper N, et al. Kistik fibrozisli 104 hastanın klinik ve laboratuvar özellikleri. *Çocuk Sağ ve Has Derg* 1995; 38: 21-31.
- Grumbach MM, Hughes LA, and Conte FA. (2003). Chapter 22. Disorders of sex differentiation. *Williams Textbook of Endocrinology*. ("10TH Ed"). Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS.
- Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Hiromasa T, Fujii-Kuriyama Y. (1988). Aberrant splicing and missense mutations cause steroid 21-hydroxylase [P-450(C21)] deficiency in humans: possible gene conversion products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:7486-90.
- Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, Gotoh O, and Fujii-Kuriyama Y. (1986). 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*, 83:2841-2845.
- Kandemir N, Yordam N. Congenital adrenal hyperplasia in Turkey: a review of 273 patients. *Acta Pediatr* 1997; 86: 22-25.
- Kharrat M, Tardy V, M'rad R, Maazoul F, Ben-Jemaa L; Refai M, Morel Y, and Chaabouni H. (2004). Molecular Genetic Analysis of Tunisian Patients with a Classic form of 21-Hydroxylase

- Deficiency: Identification of Four Novel Mutations and High Prevalence of Q318 Mutation. *The J Clin Endocrinol & Metab*, 89(1):368-374.
- Koyamata S, Toyoura T, Saisho S, Shimozaawa k, and Yata J. (2002). Genetic analysis of Japanese patients with 21-hydroxylase deficiency: Identification of a patient with a new mutation of a homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. *J Clin Endocrinol & Metab*, 87(6):2668-2673.
- Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwartz HP. (2000). Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol & Metab*, 85:1059-65.
- Lajik S, Wedell A, Bui TH, Ritzen EM, Holst M. (1998). Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol & Metab*, 83:3872-80.
- Lee HH. (2001). CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*, 59:293-301.
- Marshall I, New MI. (2003). Pediatric Endocrinology Chapter 8 Adrenal Disorders. Endotext.com February 12, 2003.
- Mercado AB\ Wilson RC, Cheng KC, Wei LQ, New MI. (1995). Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol & Metab*, 80: 2014-20.
- Merke DP, Bornstein SR. (2005). Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*, 365: 2125-36.
- Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acid Res*, volum 16 Number 3.
- Moran C, Azziz R, Carmina E. (2000). 21-Hydroxylase-deficient nonclassical adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*, 183:1468-74.
- Molecular diagnostics in congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). www.compgene.com.
- New MI and Betensky B. (2004). 21-Hydroxylase Deficiency. www.genetests.org
- New MI, Carlson A, Obeid J, Marshall I, Cabrera MS, Goseco A, Lin-Su K, Putnam AS, Wei JQ, Wilson RC. (2001). Prenatal diagnosis for congenital adrenal hyperplasia in 532 pregnancies. *J Clin Endocrinol & Metab*, 86:5651-7.
- Pinterova L, Garami M, Pribilincova Z, Behulova R, Mesenska R, Lukakova M and Zorad S. (2000). PCR based diagnosis of 21-hydroxylase gene defects in Slovak patients with congenital adrenal hyperplasia. *Endocrne Regul*, 34:65-72.
- Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR and Livingston C. (2002). Emery and Remoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Vol 2, Chapter 84. Congenital Adrenal Disorderse.
- Saatçi Ü, Özen S, Özdemir S, et al. Familial Mediterranean fever in children: report of a large series and discussion of the risk and prognostic factors of amyloidosis. *Eur J Pediatr* 1997; 156: 619-623.
- Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI and White PC. (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest*, 90:584-95.
- Speiser PW, Knochenauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes SJA.M, and Azziz R. (2000). A Multicenter Study of Women with Nonclassical Congenital Adrenal Hyperplasia: Relationship

- between Genotype and Phenotype. *Mol Genet & Metab*, 71:527-534.
- Speiser PW and White PC. (2003). Congenital Adrenal Hyperplasia. *N Engl J Med* 349:776-88.
- Stratakis CA and Bossis I. (2004). Genetics of the adrenal gland. *Rev Endocr & Metab Dis*, 5:53-68.
- Tokatlı A, Coşkun T, Özalp I. A retrospective evaluation of 78 cases with organic acidemia. *Doğa Tr J Med Sci* 1993; 18: 47-53.
- Tukel T, Uyguner O, Wei JQ, Yuksel-Apak M, Saka N, Song DX, Kayserili H, Bas F, Gunoz H, Wilson RC, New MI, Wollnik B. (2003). A novel semiquantitative polymerase chain reaction/enzyme digestion-based method for detection of large scale deletions/conversions of the CYP21 gene and mutation screening in Turkish families with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol & Metab*, 88(12):5893-7.
- Tusie-Luna MT and White PC. (1995). Gene conversions and unequal crossovers between CYP21 (steroid 21-hydroxylase gene) and CYP21P involve different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:10796-800.
- Uwaifo GI, Merke DP. (2003). C-11 Hydroxylase Deficiency. www.eMedicine.com,Inc.
- Votava F, Török D, Kovacs J, möslinger D, Baumgartner-Parzer SM; Solyom J, Pribilincova Z, battelino T, Lebl J, Frisch H and Waldhauser F. (2005). Estimation of the false-negative rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Europ J Endocrinol*, 152:869- 874.
- Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. (1986). Frequent deletion and duplication of the steroid 21- hydroxylase genes. *Am j hum genet*, 39:461-9.
- White PC, Curnow KM, Pascoe L. (1994). Disorders of steroid 11 beta hydroxylase isozymes. *Endocr Rev*, 15:421-438.
- White PC and Speiser PW. (2000). Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocr Rev*, 21(3):245-291.
- Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. (1995). Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol & Metab*, 80:1635-40.
- Yüce A, Koçak N, Gürakan F, et al. Wilson's disease with hepatic presentation in childhood. *Indian Pediatr* 2000; 37: 31-36.
- Zarkovic M, Ciric J, Stojanovic M, Penezic Z, Trbojevic B, Drezgic M, Nesovic M. (1999). Optimizing the diagnostic criteria for standard (250-microg) adrenocorticotropin tests in the assessment of adrenal function. *J Clin Endocrinol & Metab*, 84:3170-3.

Ek 1.
HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Bu form çocuğunuzun katılımı önerilen çalışma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmıştır. Formun düzenlenmesinde, araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmanın Adı: Türkiye’de 21-OHD hastalarında CYP21A2 geninde en sık rastlanan 9 mutasyonun sıklık ve dağılımının saptanması.

Çalışmanın Amacı: Çocuğunuzun hastalık bulguları Konjenital adrenal hiperplazi adı verilen kalıtsal bir hastalığa uymaktadır. Bu hastalıkta, en belirgin bulgu dış genital organlardaki gelişme bozuklukları olup, bu bozukluklar tedavi edilebilir niteliktedir. Bunun yanısıra bazı hastalarda görülen vücuttan fazla miktarda tuz atılması ile ortaya çıkan olaylar yaşam için tehlikeli olabilir.

Bu hastalığın en sık nedeni (%90-95) 21- hidrosilaz adı verilen bir enzimin çalışmamasıdır. Bu problem, şüpheli genital yapının en sık şekli ve yenidoğan dönemindeki ölümlerin en sık endokrin nedenidir. Hastalığın kesin tanısı için DNA incelemesi gerekmektedir. Dünyada bu hastalığa en sık neden olan DNA üzerinde 9 değişiklik (mutasyon) bildirilmiştir. Bu çalışmada bu 9 mutasyonun Türkiye’deki sıklığına bakılacaktır. Doğum öncesi tanı ve tedavinin bu hastalıkta ne kadar kritik olduğu dikkate alınırsa bu çalışma sonra tarama testleri için referans olarak kullanılabilir.

Çalışmanın Protokolü: Bu çalışmada 0-18 yaş arası, 100 hasta çalışılacaktır. Çalışmaya katılacak hastalardan 5 ml kan alınarak gen düzeyinde çalışma yapılacaktır. Çalışmaya katılacak bireylerin kimlikleri gizli tutulacak, elde edilen DNA’lar anonim olarak bilimsel amaçlı diğer araştırmalarda da kullanılabilir.

Bu çalışmanın çocuğunuzda neden olabileceği herhangi bir yan etkisi bulunmamaktadır.

Bu çalışma sizin için ekonomik açıdan bir yük getirmeyecektir.

Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabileceksiniz. Ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabileceksiniz.

Ben....., bu çalışma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim.

Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

Bu bilgiler ışığında çocuğum’ın bu çalışmaya elde edilen DNA’sının;

başka amaçla kullanılmaması

kimliği gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer araştırmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile katılmasına izin veriyorum.

Hastanın adı-Soyadı:

Sorumlu Araştırmacı:

Veli:

İmza:

İmza:

Tarih:

Tanık:

İmza:

Ek 2.
HASTA KAYIT FORMU

Hastanın adı –soyadı:
Protokol no:
Araştırma kayıt no:
Yaşı:
Hastanın boyu:
Hastanın kilosu:
Tanı yaşı:

Tarih:

Hasta klinik bulguları:

Ürojenital bulgular

- Labial füzyon Skrolotazisiyon
 Klitoromegali Büyük penis
 Diğer:

Adrenal kriz öyküsü: Var Yok
Kemik yaşı artışı: Var Yok
Erken kıllanma: Var Yok
Hızlı büyüme: Var Yok
Boy kısalığı: Var Yok
Akne: Var Yok
Hirsutizm: Var Yok
Adet bozukluğu: Var Yok
Ek bulgular:

Moleküler tanı:

- A/C659G (intron2 splice mutasyonu)
 Ekzon3'teki 8bp'lik delesyon
 Genin delesyonu
 P30L
 I172N
 Ekzon 6 mutasyonu
 V281L
 Q318X
 R356W

Araştırmacının adı-soyadı:
İmza: