



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ

**Το φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε ασθενείς
με Συγγενή Υπερπλασία Επινεφριδίων... ές γην έναλιαν Κύπρον**

Νίκος Σκορδής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

Νόμιμη κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος: «Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα» (Ν. 5343/32 άρθρο 202 παράγραφος 2).

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σκορδή Νικολάου: 1-6-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 615^α/16-10-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Τσατσούλης Αγαθοκλής, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Δέλτας Κων/νος, Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Παν/μίου Κύπρου

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 14-7-2009

«Ταυτοποίηση των μεταλλάξεων του γονιδίου CYP21 σε Κυπρίους ασθενείς με συγγενή υπερπλασία επινεφριδίων» .

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 753^α/18-6-2013

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Τσατσούλης Αγαθοκλής, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Γιάπρος Βασίλειος Αναπληρωτής Καθηγητής Νεογνολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Δέλτας Κων/νος, Καθηγητής Γενετικής, Τμήμα Βιολογικών Επιστημών, Παν/μίου Κύπρου
5. Χάλλα Άννα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Σιώμου Αικατερίνη Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής με έμφαση στην Παιδιατρική Νεφρολογία Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Τίγκας Στυλιανός Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 27-6-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τζαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



ΤΕΥΚΡΟΣ

... **ες γην εναλίαν Κύπρον** ου μ' εθέσπισεν
οικείν Απόλλων, όνομα νησιωτικόν
Σαλαμίνα θέμενον της εκεί χάριν πάτρας.

.....
ΕΛΕΝΗ: Ουκ ήλθον ες γην Τρωάδ' , αλλ' είδωλον ήν.

ΤΕΥΚΡΟΣ: ...στη θαλασσινή Κύπρο, όπου μου όρισε ο Απόλλων να κατοικώ,
δίνοντάς της το νησιώτικο όνομα Σαλαμίνα ως ανάμνηση εκείνης της πατρίδος
μου

.....
ΕΛΕΝΗ: Εγώ δεν πήγα στην Τρωάδα, ένα είδωλό μου ήταν

ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ, ΕΛΕΝΗ (412 π.Χ.)



Στους γονείς μου,

στην γυναίκα μου Αγνή,

στα παιδιά μου

Στέφανο και Ολίβια

Δημοσιεύσεις από τη σπουδή της παρούσας διατριβής

1. **Skordis N**, Kyriakou A, Ioannou YS, Varvaresou A, Dracopoulou – Vabouli M, Patsalis PC, Neocleous V and Phylactou LA. Molecular Defects of the CYP21A2 Gene in Greek Cypriot patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. **Hormone Research in Paediatrics 2011; 75(3): 180-186.**
2. Neocleous V, Ioannou YS, Bartsota M, Costi C, **Skordis N**, Phylactou LA. Rare mutations in the CYP21A2 gene detected in congenital adrenal hyperplasia. **Clinical Biochemistry 2009 ;42: 1363-1367**
3. **Skordis N**, Shammas C, Efstathiou E, Kaffe K, Neocleous V, Phylactou LA. Endocrine profile and phenotype-genotype correlation in unrelated patients with non-classical congenital adrenal hyperplasia. **Clinical Biochemistry 2011 Aug; 44 (12): 959-63**
4. **Skordis N.** Underlying Genetic Defects in Diseases of Sexual Development in the Island of Cyprus Support the Founder Effect. **Recent Advances Research Updates 2012 ;1(10): 51-74**
5. Neocleous V, Shammas C, Phedonos AP, Karaoli E, Kyriakou A, Toumba M, Phylactou LA, **Skordis N.** Genetic defects in the *CYP11A* gene in heterozygous girls with premature adrenarche and adolescent females with hyperandrogenemia. **Georgian Med News 2012 Sep;(210):40-47**
6. Shammas C, Neocleous V, Toumba M, Costi C, Phedonos AAP, Efstathiou E, Kyriakou A, Phylactou LA and **Skordis N.** Overview of genetic defects in Endocrinopathies in Cypriots; evidence of a founder effect. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2012 Sep; 16(9):1073-1079.**
7. Phedonos A, Shammas C, **Skordis N**, Kyriakides T, Neocleous V, Phylactou LA. High carrier frequency of 21-hydroxylase deficiency in Cyprus. **Clinical Genetics 2013 Apr 22. doi: 10.1111/cge.12153**
8. **Skordis N**, Shammas C, Phedonos AAP, Toumba M, Andreou E, Styliamou C, E, Kyriakou A, Tanos V, Picolos M, Kyriakides TC, Neocleous V, Phylactou LA and. Carrier status for 21-hydroxylase deficiency can be a factor in the variable phenotype of hyperandrogenism. **Clinical Endocrinology - submitted**

Καλύτερο είναι το λίγο που έχει γίνει σωστά, παρά το πολύ που έγινε χωρίς τελειότητα - Πλάτων (427-347 π.Χ. , Φιλόσοφος)

πρόλογος

Η εκπόνηση μιας διδακτορικής διατριβής σε αυτή τη φάση της ζωής μου είναι πρόσκληση και πρόκληση ταυτόχρονα. Η πρόσκληση πηγάζει από την ανεξήγητη και αδιάκοπη περιέργεια για την αναγνώριση των εν σοφία προγραμματισμένων βιολογικών διεργασιών που επιτελούνται εννοηστρομμένα στον οργανισμό μας και διατηρούν ακέραια τη σωματική, πνευματική και ψυχική μας αρμονία. Η πρόκληση ακολουθεί νομοτελειακά αφού επιβάλλεται από τις εν πορεία ανατροπές και εμπλουτισμό της αποθηκευμένης γνώσης με τα νεοφανή κελεύσματα των ραγδαίων εξελίξεων στο χώρο της μοριακής Γενετικής. Η αέναη προαγωγή της γνώσης ως αδήριτη ανάγκη ολοκληρώνει τον εν εξελίξει άνθρωπο, ο οποίος λειτουργεί με ανησυχία και επιθυμία να κατανοήσει και να επεξεργαστεί το περιβάλλον, αναζητώντας απαντήσεις σε διάφορα φαινόμενα μέσω της επιστήμης.

Έτσι φιλόδοξα ξεκίνησε αυτή η προσπάθεια που τελικά αποδείχτηκε να είναι ένα ταξιδάκι αναψυχής που ευτυχώς έκρυβε μόνο θαύματα. Οι θάλασσες ήρεμες, το καράβι καλοτάξιδο και τα λιμάνια απάνεμα. Ο Αίολος φρόντισε με επιμέλεια τους ασκούς και ο Ζέφυρος στοργικά χάραζε τις πορείες πλεύσης. Τα θερινά μελήματα προσπελάσιμα από το επιδέξιο πλήρωμα. Η ανιδιοτελής και φιλότιμη στήριξη των φίλων συνεργατών για να είναι ομαλή η πορεία της διαδρομής και να ολοκληρωθεί η παρούσα διατριβή ήταν θεμελιώδης, έτσι που χωρίς την ουσιαστική τους συμμετοχή να ήταν αδύνατο όχι μόνο να εγκαταλείψω την αφετηρία αλλά και να ακουμπήσω το νήμα στο τέρμα του αγωνιστικού διαδρόμου.

Θα ήθελα κατ'αρχήν να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή και γνώριμο από τα φοιτητικά έδρανα Αγαθοκλή Τσατσούλη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο αντικείμενο. Ευχαριστίες επίσης απευθύνω και στα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, Καθηγητή Ιωάννη Γεωργίου για τη συμμετοχή του στην κρίση της παρούσας εργασίας και στο φίλο και από καιρού συνεργάτη Καθηγητή Κώστα Δέλτα για τη στήριξη και τις σχολαστικές και εύστοχες υποδείξεις του προϊόν της πολύχρονης και αναγνωρισμένης παρουσίας του στον ερευνητικό χώρο. Ακόμα ευχαριστώ θερμά και τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους στην αξιολόγηση αυτής της διατριβής.

Στη συλλογή του υλικού η πρόθυμη συμμετοχή και βοήθεια του προσωπικού του τμήματος Παιδοενδοκρινολογίας στο Μακάριο Νοσοκομείο ήταν πρωταρχική. Ευχαριστώ τις συναδέλφους Στέλλα Νικολάου, Κατερίνα Καφφέ, Ελισάβετ Ευσταθίου και Λαμπρινή Γιαννακκίδη για τη συγκέντρωση και ταξινόμηση του υλικού και πιο πολύ για τη συμπαράσταση στις κρίσιμες ώρες που έπρεπε να αφιερώσω στη σπουδή του θέματος. Ευχαριστώ επίσης θερμά τις νοσηλεύτριες του τμήματος Θεονίτσα Αψιώτου, Θεογνωσία Γεωργίου και Γεωργία Κάρκα που με ακούραστο ζήλο και υπομονή διεκπεραίωναν τις κλινικές δοκιμασίες, φρόντιζαν για την ομαλή λειτουργία της κλινικής και άλλα πολλά.

Η συμβολή της ενθουσιώδους ερευνητικής ομάδας από το τμήμα της Μοριακής Λειτουργίας και Θεραπείας στο Ινστιτούτο Νευρολογίας και Γενετικής Κυπρου υπήρξε καταλυτική. Η συνεργασία με τους εξαίρετους αυτούς επιστήμονες εξελίχθη όπως άλλωστε έπρεπε σε ειλικρινή και αποδεδειγμένη φιλία και τους ευχαριστώ από καρδιάς. Η πρώτη επιστημονική επαφή με το Ινστιτούτο χρονολογείται από το 1995, όταν ξεκίνησε η συνεργασία με τον νυν διευθυντή Καθηγητή Φίλιππο Πατσαλή στη προσπάθειά μας να εξερευνήσουμε τα γενετικά μυστήρια, που καθορίζουν τη κλινική έκφραση των ενδοκρinoπαθειών. Η αποκάλυψη των μυστηρίων απέδωσε καρπούς και συνεχίζεται.

Η επίπονη και λεπτομερής εργαστηριακή προσπάθεια του υλικού της μελέτης έγινε με την καθοδήγηση του υπεύθυνου του τμήματος καθ. Λεωνίδα Α. Φυλακτού και του Δρ Βάσου Νεοκλέους. Η συνεισφορά του *low profile* Δρ Χρίστου Σιαμμά και της γλυκύτατης Αλεξίας Φαίδωνος στην ανάλυση του DNA των ασθενών και μαρτύρων για ανίχνευση γενετικών εκτροπών είναι ανεκτίμητη και τους ευχαριστώ ιδιαίτερα. Ο Χρίστος επιπλέον ανέλαβε την άχαρη τακτοποίηση της βιβλιογραφίας, την οποία διεκαπεραίωσε με εντυπωσιακή ταχύτητα προφανώς λόγω της ευστροφίας του μυαλού που διαθέτει. Η στατιστική επεξεργασία έγινε από τον εις Yale διαπρέποντα Δρ Τάσσο Κυριακίδη και από τον επιμελή μαθητή Δρ Σάββα Σάββα, τους οποίους ειλικρινά ευχαριστώ, όπως επίσης και την κ. Έλενα Κυριάκου, η οποία ανέλαβε και περάτωσε την ηλεκτρονική συναρμολόγηση του κειμένου.

Ευχαριστώ τα μέγιστα τον εκλεκτό συνοδοιπόρο Βάσο Νεοκλέους, ο οποίος ως οργανωτικός υπεύθυνος ανέλαβε από την αρχή την ταξινόμηση του υλικού, την ανάλυση των αποτελεσμάτων, τη παρουσίαση των ευρημάτων σε διεθνή συνέδρια καθώς και τη δημοσίευση τους σε peer reviewed περιοδικά. Η συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας παραμένει ανεκτίμητη.

Από καρδιάς ευχαριστώ τον επιστήθιο συμπαραστάτη Δρ Ανδρέα Κυριάκου, για την αισθητική αναβάθμιση της γραφής και όχι μόνο. Η οξυδερκής και αριστοτεχνική του παρέμβαση στο γραπτό λόγο ήταν πρωταρχικής σημασίας για το αίσιο φινάλε αυτής της παράστασης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	8
1. Εισαγωγή	9
2. Βιοχημεία ΣΥΕ	15
Α. Φυσιολογική σύνθεση στεροειδών	15
Β. Ρύθμιση βιοσύνθεσης επινεφριδιακών στεροειδών	18
Β1. Παραγωγή Κορτιζόλης	18
Β2. Έκκριση Αλδοστερόνης	19
Γ. Διαταρχή της στεροειδογένεσης λόγω έλλειψης της 21- Υδροξυλάσης	20
3. Παθοφυσιολογία της ΣΥΕ	23
Α. Σεξουαλική διαφοροποίηση	23
Β. Εμβρυολογία των επινεφριδίων	24
Γ. Προγεννητική αρρενοποίηση	25
Δ. Απώλεια άλατος	28
Ε. Σημεία υπερανδρογοναιμίας μετά τη γέννηση	29
ΣΤ. Αναπαραγωγική ικανότητα στην κλασσική μορφή της ΣΥΕ	30
Η. Νευροφυσιολογία της ΣΥΕ - Επίδραση στην ταυτότητα του φύλου	32

4. Μη κλασσική μορφή ΣΥΕ	33
A. Κλινικά σημεία	33
B. Συχνότητα	36
Γ. Ετεροζυγώτες	36
5. Διάγνωση της έλλειψης 21-Υδροξυλάσης	37
A. Αμφίβολα γεννητικά όργανα	37
B. Ανιχνευτικά προγράμματα νεογνών	39
Γ. Ορμονικός προσδιορισμός	40
6. Γονίδιο CYP21A2	41
A. Δομή του γονιδίου CYP21A2	41
B. Μεταγραφή	45
Γ. Σύνδεση με HLA	47
Δ. Μεταλλάξεις που προκαλούν έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης	48
1. Απαλείψεις και μεγάλες μετατροπές	50
2. Μη νοηματικές (nonsense) και αλλαγής πλαισίου (frameshift) μεταλλάξεις	52
3. A or C→G μετάλλαξη στο ιντρόνιο 2	52
4. p.Pro30→Leu (P30L)	53
5. p.Ile172→Asn (I172N)	54
6. p.Val281→Leu (V281L)	55

7. Άλλες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί	55
7. Θεραπεία	56
A. Αναπλήρωση γλυκοκορτικοειδών	56
B. Αντικατάσταση με αλατοκορτικοειδή	59
Γ. Επινεφριδιεκτομή	59
Δ. Χειρουργική διόρθωση	60
Ε. Προγεννητική θεραπεία	61
8. Σκοπός	66
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
1. Υλικό και Μέθοδοι	68
A. Ασθενείς	68
B. Κατηγοριοποίηση ασθενών βάσει υποκείμενης μετάλλαξης	70
Γ. Απομόνωση του DNA	71
Δ. Παραγωγή του γονιδίου <i>CYP21A2</i> με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	72
Ε. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR για περαιτέρω ανάλυση	73
Στ. Προσδιορισμός της αλληλουχίας προϊόντων της PCR σε αυτόματο αναλυτή (ABI Sequencer)	73
Η. Ανίχνευση Διπλασιασμών και Μεγάλων Απαλείψεων του γονιδίου <i>CYP21A2</i>	74

Θ. Στατιστική ανάλυση	75
2. Αποτελέσματα	76
A. 47 μη συσχετιζόμενοι ασθενείς με ΣΥΕ που έφεραν δυο μεταλλάξεις	76
B. Ανάλυση του γονοτύπου <i>CYP21A2</i> σε 171 θήλεις με κλινική υπερανδρογοναιμία	81
B1. Αναγνώριση μίας μετάλλαξης σε 66 θήλεις	81
B2. Μη αναγνώριση μετάλλαξης σε 105 θήλεις	82
B3. Πολυμορφισμοί σε μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου <i>CYP21A2</i> (promoter/5'UTR και 3'UTR)	83
Γ. Ασθενείς με σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο <i>CYP21A2</i>	84
Δ. Συχνότητα φορέων μεταλλάξεων του γονιδίου <i>CYP21A2</i> στον Κυπριακό πληθυσμό	86
E. Πίνακες	88
ΣΤ. Σχήματα	101
3. Συζήτηση	109
4. Συμπεράσματα	128
5. Περίληψη	130
6.Περίληψη με εκτενή ανάλυση στην Αγγλική	135
7.Βιβλιογραφία	143

γενικό μέρος

1. Εισαγωγή

Η εικόνα που στερεότυπα φέρνει στο μυαλό η ανάγνωση της πάθησης Συγγενής Υπερπλασία Επινεφριδίων (ΣΥΕ) είναι αυτή του πάσχοντος θήλεος νεογνού με τα αμφίβολα γεννητικά όργανα, αφού είναι η πιο συχνή αιτία διαταραχών σεξουαλικής διαφοροποίησης και επιπλέον η πιο συχνά απαντούμενη αιτία αρρενοποίησης 46, ΧΧ εμβρύου - άλλοτε επονομαζόμενου θήλυ ψευδερμαφρόδιτου. Ανατρέχοντας στην ιστορία και στις διηγήσεις η Maria New ισχυρίζεται ότι η Πάπισσα Ιωάννα, ένα μυθικό ή όντως υπαρκτό πρόσωπο έπασχε από την απλή αρρενοποιητική μορφή της ΣΥΕ. Η Πάπισσα Ιωάννα, με προφανώς 46, ΧΧ καρυότυπο, και ακέραια έσω γεννητικά όργανα θήλεος, λόγω εκσεσημασμένης αρρενοποίησης θεωρήθηκε αγόρι και έτσι ανατράφηκε και μεγάλωσε. Η καριέρα της/του ως κληρικός επισφραγίστηκε με την ανάδειξη στο ανώτατο αξίωμα του Πάπα το 800 μ.Χ (1). Ο μύθος στη συνέχεια αναφέρει ότι κατά τη διάρκεια θρησκευτικής πομπής, η Πάπισσα Ιωάννα κατασπαράχθηκε από το πλήθος όταν γέννησε ένα παιδί, - εικόνα 1 (<http://www.examiner.com/article/visit-the-shrine-of-a-woman-pope>) - καρπό εμφανώς ενός ομοφυλόφιλου ως άνδρα με άνδρα έρωτα. Η βιολογική ερμηνεία του μύθου υποστηρίζεται από παραδείγματα στη σύγχρονη ιατρική όπου περιγράφονται ενήλικες εμφανισιακά άνδρες με παρουσία αιμορραγίας, ενίοτε κυκλικής από το πέος, που ουσιαστικά είναι θήλεις πάσχουσες με ΣΥΕ που εμφανίζουν έμμηνο ρύση (2). Λόγω δε του τραγικού αυτού συμβάντος κατασκευάστηκε τότε μία καρέκλα (Sedia Gestatoria) όπου άφηνε ένα κενό

έτσι ώστε να παρέχεται η δυνατότητα ψηλάφησης των όρχεων του υποψήφιου Πάπα – εικόνα 2 (<http://dstrams.wordpress.com/>). Ο νεαρός τότε κληρικός που είχε αυτό το καθήκον αναφώνουσε : ***Testiculos habet et bene pendentes*** - έχει καλά σχηματισμένους όρχεις και όλοι οι κληρικοί απαντούσαν: ***Habe ova noster papa***, τουτέστιν ο πατέρας μας είναι αρσενικός.



Εικόνα 1. Σκηνή της πομπής με τη γέννηση του παιδιού της Πάπισσας Ιωάννας

Εικόνα 2 . Η περίφημη καρέκλα Sedia Gestatoria σε σύγχρονη έκδοση

Προμοίως ο φίλτατος Νεοκλής Γεωργόπουλος σε μία ρηξικέλευθη αναφορά ισχυρίζεται ότι η μυθική Βαυώ έπασχε από ΣΥΕ (3). Η Βαυώ ήταν εμφανισιακά γυναίκα με αμφίβολα γεννητικά όργανα αφού διέθετε κόλπο και μικρό πέος. Η Βαυώ, παντρεμένη με δύο παιδιά περιφερόταν στα Ελευσίνια μυστήρια και προκαλούσε το γέλωτα επιδεικνύοντας τα γεννητικά της όργανα - **Ως ειπούσα πέπλους ανεσύρετο, δείξε δε πάντα σώματος ουδέ πρέποντα τύπον** – εικόνα 3 http://www.sacredsource.com/Isis-as-Baubo-Statue-9-3_4/productinfo/BI/#.UZiYqJHKE0. Η βιολογική ερμηνεία στηρίζεται στο ότι ο συνδυασμός των φυσιολογικών θήλυ έσω και αρρενοποιημένων έξω γεννητικών οργάνων κάλλιστα δύναται να αποδοθεί στην απλή αρρενοποιητική μορφή της ΣΥΕ αφού οι πάσχουσες με τη συγκεκριμένη μορφή έχουν φυσιολογική αναπαραγωγική ικανότητα. Η θέα των γεννητικών οργάνων της Βαυούς προκάλεσε και τον γέλωτα στη λυπημένη, από τον χαμό της θυγατέρας της Περσεφόνης, Θεάς Δήμητρας.



Εικόνα 3. *‘Ως ειπούσα πέπλους ανεσύρετο, δείξε δε πάντα σώματος ουδέ πρέποντα τύπον’.*

Η ΣΥΕ είναι η πιο συχνή αιτία αμφίβολων γεννητικών οργάνων. Οφείλεται σε ποσοστό 90–95% σε έλλειψη του ενζύμου 21 – Υδροξυλάσης. Τα θήλεα πάσχοντα νεογνά με την σοβαρή κλασσική μορφή της ΣΥΕ εκτίθενται προγεννητικά σε υπερβολική ποσότητα ανδρογόνων με συνέπεια να παρουσιάζουν αρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων κατά τη γέννηση. Παρόλο ότι η ΣΥΕ έχει περιγραφεί στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η κατανόηση της νόσου, των ορμονικών διαταραχών και του τρόπου κληρονομικής μεταβίβασής της έχει επιτευχθεί στα μέσα του 20^{ου} αιώνα με τις εξελίξεις της ιατρικής επιστήμης (4).

Η θεμελιώδης διαταραχή στους πάσχοντες από έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης (21 OHD) είναι η ανικανότητα επαρκούς σύνθεσης κορτιζόλης, γεγονός που οδηγεί στην αντισταθμιστική υπερπαραγωγή της Κορτικοεκλυτίνης (Corticotropin Releasing Hormone - CRH) και της Φλοιοεπινεφριδοτρόπου ορμόνης (Adrenocorticotropic hormone - ACTH) από τον υποθάλαμο και την υπόφυση αντίστοιχα. Τελικό αποτέλεσμα είναι η υπερπλασία των επινεφριδίων και η υπερβολική παραγωγή ανδρογόνων λόγω της εκτροπής της μεταβολικής οδού, η οποία δεν απαιτεί την παρουσία της 21 – Υδροξυλάσης. Τα ήπια ανδρογόνα – κυρίως η Ανδροστενεδιόνη - μεταβολίζονται σε ισχυρά ανδρογόνα (Τεστοστερόνη και Διυδροτεστοστερόνη) με αποτέλεσμα την αρρενοποίηση των έξω γεννητικών οργάνων στα θήλεα νεογνά και την επιτάχυνση της αύξησης και οστικής ωρίμανσης και στα δύο φύλα. Σε ποσοστό 75% οι πάσχοντες από έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης αδυνατούν να συνθέσουν και Αλδοστερόνη με συνέπεια την διαταραχή της ομοιοστασίας του Νατρίου και Καλίου και αντισταθμιστική αύξηση

της Ρενίνης. Η με απώλεια άλατος (Salt Wasting - SW) μορφή της ΣΥΕ είναι απειλητική για τη ζωή λόγω της κλινικής προβολής με σοβαρή υπονατρίαιμική αφυδάτωση. Σε αντιδιαστολή οι ασθενείς με επαρκή σύνθεση Αλδοστερόνης που προβάλλουν μόνο με αρρενοποιητικά σημεία έχουν την απλή αρρενοποιητική μορφή (Simple Virilizing - SV). Επιπρόσθετα και εξίσου σημαντική είναι η μη κλασσική μορφή (Non Classic – NC), όπου υπάρχει σε κάποιο βαθμό παραγωγή της 21 – Υδροξυλάσης και προβάλλει κλινικά στην παιδική ή εφηβική ηλικία ή ακόμα και αργότερα στην ενήλικη ζωή. Τα χαρακτηριστικά των διαφόρων μορφών της ΣΥΕ απεικονίζονται τροποποιημένα στον πίνακα 1 (5).

Πίνακας 1. Μορφές Συγγενούς Υπερπλασίας Επινεφριδίων οφειλόμενες σε έλλειψη της 21 - Υδροξυλάσης

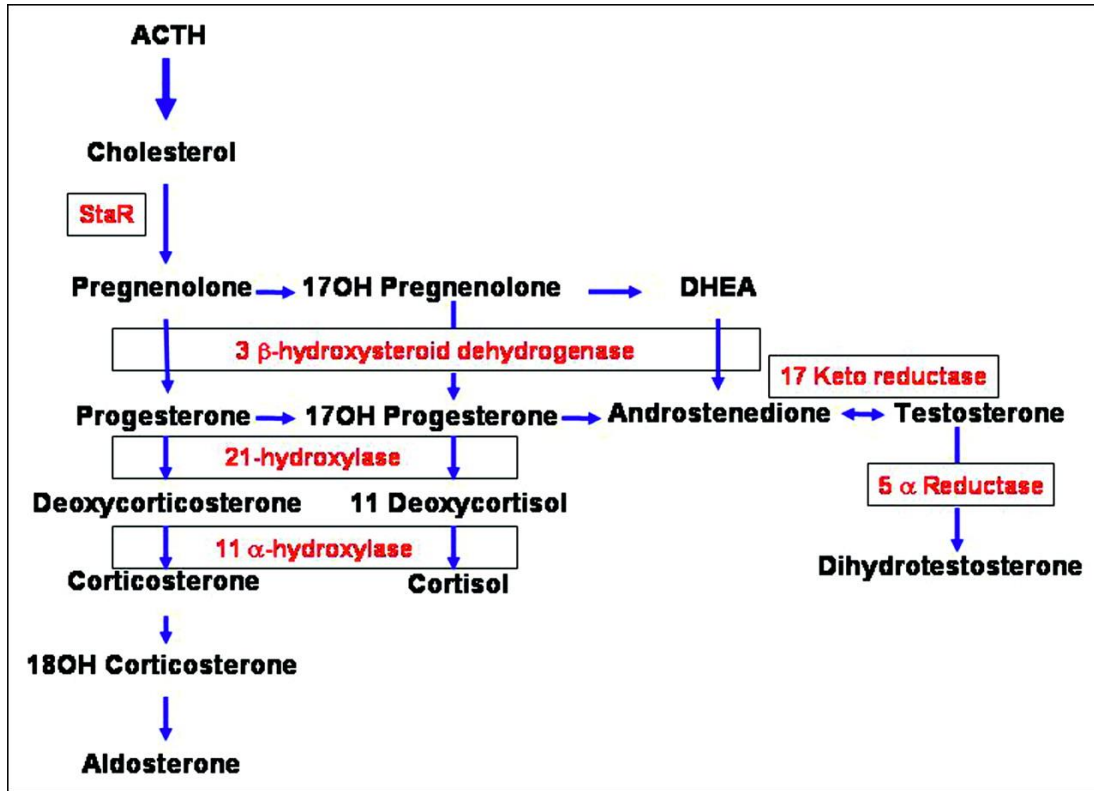
Φαινότυπος	Κλασσική με απώλεια άλατος		Κλασσική απλή αρρενοποιητική		Μη κλασσική	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Ηλικία διάγνωσης	Νεογνική - 6μ	Νεογνική - 1μ	2-4 χρ	Νεογνική - 2 χρ	Παιδί - Ενήλικας	Παιδί - Ενήλικας
Γεννητικά όργανα	Φυσιολογικά	Αμφίβολα	Φυσιολογικά	Αμφίβολα	Φυσιολογικά	+/- ↑ κλειτορίδα
Αλδοστερόνη		↓		Φυσιολογική		Φυσιολογική
Ρενίνη		↑		ίσως ↑		Φυσιολογική
Κορτιζόλη		↓		↓		Φυσιολογική
17-OH-Π		> 600 nmol/l		> 300-600 nmol/l		30- 300 nmol/l (μετά από διέγερση με ACTH)
Συχνότητα		1/20,000		1/60,000		1/1000
Τυπικές μεταλλάξεις		Απάλειψη Μεγάλη μετατροπή IVS2-13A/C>G I236N/V237E/M239K Q318X		I172N IVS2-13A/C>G		V281L P30L
% Ενζυματική δραστηριότητα		0		1		20-50

2. Βιοχημεία ΣΥΕ

A. Φυσιολογική συνθεση στεροειδών

Το πρώτο βήμα στην βιοσύνθεση των στεροειδών όπως φαίνεται στην εικόνα 4 (<http://usmlehelpeasy.blogspot.com/2013/01/congenital-adrenalhyperplasia.html>) είναι η είσοδος της χοληστερόλης στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, όπου εδράζεται το σύστημα αποκοπής των πλάγιων αλυσίδων της χοληστερόλης (CYP11A, adrenodoxin, adrenodoxin reductase). Το σύστημα αυτό ρυθμίζεται από τη οξεία ρυθμιστική πρωτεΐνη της στεροειδογένεσης (Steroidogenic Acute Regulatory protein- StAR), η σύνθεση της οποίας αυξάνεται ταχέως, μετά από διέγερση από την ACTH στη σηλιδωτή ζώνη και μετά από αύξηση της συγκέντρωσης ενδοκυττάριου ασβεστίου στη σπειροειδή ζώνη (3, 4). Ο μηχανισμός με τον οποίο η πρωτεΐνη StAR διευκολύνει την μεταφορά της χοληστερόλης διαμέσου της μεμβράνης των μιτοχονδρίων είναι άγνωστος.

Το αρχικό ενζυματικό βήμα στην βιοσύνθεση των στεροειδών είναι η μετατροπή της χοληστερόλης (ενός C₂₇ μορίου) στην C₂₁ πρεγνενολόνη (6). Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το CYP11A που είναι ένα μιτοχονδριακό ένζυμο της ομάδας του κυτοχρώματος P450. Η Πρεγνενολόνη είναι η κοινή πρόδρομος ουσία για όλα τα υπόλοιπα στεροειδή και έτσι μεταβολίζεται στη συνέχεια από αριθμό ενζύμων.



Εικόνα 4. Βιοσύνθεση στεροειδών στα επινεφρίδια

Η βιοσύνθεση των αλατοκορτικοειδών λαμβάνει χώρα στη σπειροειδή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων. Το ένζυμο 3β-υδροξυστεροειδική δευδρογενάση (3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3β-HSD) στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια μετατρέπει την Πρεγενολόνη σε Προγεστερόνη (7). Η Προγεστερόνη υδροξυλιώνεται στη θέση 21 στο ενδοπλασματικό δίκτυο από το ένζυμο CYP21 (P450c21, 21-Υδροξυλάση) για να παραχθεί η 11-Δεοξυκορτικοστερόνη (DOC). Η μετατροπή της 11-Δεοξυκορτικοστερόνης σε αλδοστερόνη περιλαμβάνει 3 διαδοχικές αντιδράσεις: 11β υδροξυλίωση της 11-Δεοξυκορτικοστερόνης για το σχηματισμό Κορτικοστερόνης (compound B), 18 υδροξυλίωση της

κορτικοστερόνης για το σχηματισμό 18 υδροξυκορτικοστερόνης, και τέλος 18 οξειδωση για να παραχθεί Αλδοστερόνη. Οι τρεις αυτές αντιδράσεις καταλύονται από ένα ένζυμο, τη συνθετάση της αλδοστερόνης- CYP11B2 (8).

Η παραγωγή της Κορτιζόλης, του κατεξοχόν γλυκοκορτικοειδούς στον άνθρωπο, επιτελείται στη στηλιδωτή ζώνη του φλοιού. Εκεί το ένζυμο CYP17 (P450c17, 17α-υδροξυλάση/17, 20 λυάση) στο ενδοπλασματικό δίκτυο μετατρέπει την Πρεγνενολόνη σε 17α-υδροξυπρεγνενολόνη (9). Η 3β-υδροξυστεροειδική δευδρογενάση στη στηλιδωτή ζώνη χρησιμοποιεί την 17α-υδροξυπρεγνενολόνη σαν υπόστρωμα για την παραγωγή της 17α-υδροξυπροεστερόνης, η οποία υδροξυλιώνεται στη θέση 21 από το ένζυμο 21 – Υδροξυλάση (CYP21) για να παραχθεί η 11-Δεοξυκορτιζόλη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε Κορτιζόλη στα μιτοχόνδρια από το ένζυμο CYP11B1 (P450c11, 11β-υδροξυλάση).

Στην δικτυωτή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων και στις γονάδες η δράση των ενζύμων 17,20-λυάση και CYP17 μετατρέπει την 17α-υδροξυπρεγνενολόνη σε Δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA) C₁₉ πρόδρομο μόριο των γλυκοκορτικοειδών και των στεροειδών του φύλου. Η DHEA ακολούθως μετατρέπεται σε Ανδροστενεδιόνη από το ένζυμο 3β-HSD. Στις γονάδες η Ανδροστενεδιόνη ανάγεται από το ένζυμο 17β- υδροξυστεροειδική δευδρογενάση σε Τεστοστερόνη (10). Η Τεστοστερόνη μεταβολίζεται σε Διυδροτεστοστερόνη από το ένζυμο 5α-ρεδουκτάση στους ιστούς όπου ασκείται η δράση των ανδρογόνων (11).

B. Ρύθμιση βιοσύνθεσης επινεφριδιακών στεροειδών

B1. Παραγωγή Κορτιζόλης.

Η έκκριση της Κορτιζόλης ρυθμίζεται κυρίως από την ACTH, η οποία είναι ένα πεπτίδιο με 39 αμινοξέα το οποίο παράγεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και συντίθεται ως μέρος της μεγάλου μοριακού βάρους πρόδρομου ουσίας Προοπιομελανοκορτίνης (Proopiomelanocortin - POMC). Η POMC ανευρίσκεται σε μεγάλο αριθμό εξωυποθαλαμικών ιστών, όπως στο γαστρεντερικό σύστημα, στους όρχεις καθώς και σε αριθμό όγκων. Η ACTH ασκεί τη δράση της μέσω ενός ειδικού πρωτεΐνης G υποδοχέα αυξάνοντας τα επίπεδα του κυκλικού AMP - cAMP (12). Το cAMP έχει βραχύχρονη (λεπτά / ώρες) δράση στην μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια (13) αλλά παρατεταμένη (ώρες/μέρες) δράση (μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης A) στην μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα απαραίτητα για την βιοσύνθεση της κορτιζόλης ένζυμα (14). Η ACTH επίσης επηρεάζει και τα άλλα στάδια της στεροειδογένεσης όπως και την πρόσληψη της χοληστερόλης από τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος. Επιπλέον, η ACTH ρυθμίζει το μέγεθος των επινεφριδίων και διεγείρει τα μελανοκύτταρα, εξ ου και η υπέρχρωση, η οποία παρατηρείται στη νόσο του Addison και στη γεννητική κυρίως περιοχή των πασχόντων με ΣΥΕ νεογνών.

Η CRH είναι η κύρια υποθαλαμική ορμόνη, η οποία διεγείρει την παραγωγή της ACTH από την υπόφυση. Η απελευθέρωση της ACTH ρυθμίζεται συνεργιστικά με την CRH και από την Βαζοπρεσσίνη, ένα πεπτίδιο του οπισθίου λοβού της υπόφυσης. Η CRH μεταφέρεται στην πρόσθια υπόφυση και διεγείρει την έκκριση

της ACTH μέσω ενός ειδικού υποδοχέα που δρα μέσω του cAMP. Η CRH εκκρίνεται σε ώσεις, οδηγώντας έτσι στην επεισοδιακή έκκριση της ACTH και τελικά στον κίρκαδιανό ρυθμό της έκκρισης της κορτιζόλης. Η ολική ημερήσια παραγωγή Κορτιζόλης εξαρτάται από τον αριθμό των περιόδων έκκρισης των CRH και ACTH (15, 16).

Τα επίπεδα των γλυκοκορτικοειδών επηρεάζονται από αριθμό παραγόντων όπως μεταβολικοί, φυσικοί, συναισθηματικοί μέσω της παραγωγής ACTH, αφού διεγερθεί από την υποθαλαμική CRH και την Βαζοπρεσσίνη. Η Κορτιζόλη είναι ο κατεξοχήν ρυθμιστής του άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Επινεφρίδια {Hypothalamic – Pituitary – Adrenal (HPA) axis} και της παραγωγής ACTH και CRH μέσω της αρνητικής παλίνδρομης ρύθμισης που ασκείται στους υποδοχείς στεροειδών τύπου II και επιπρόσθετα δρα σε ανώτερες περιοχές του φλοιού, οδηγώντας έτσι σε διέγερση της έκκρισης CRH (17).

B2. Έκκριση Αλδοστερόνης

Ο ρυθμός βιοσύνθεσης της Αλδοστερόνης είναι 100 έως 1000 φορές μικρότερος από αυτόν της σύνθεσης της Κορτιζόλης. Ρυθμίζεται κυρίως από το σύστημα ρενίνης-αγγειοτενσίνη και τα επίπεδα καλίου στον ορό, με την ACTH να έχει μόνο βραχύχρονη δράση (18). Η αγγειοτενσίνη II συνδέεται με τους υποδοχείς της στη σπειροειδή ζώνη του φλοιού των επινεφριδίων, διεγείροντας τη φωσφολιπάση C. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυττάρια αύξηση του ασβεστίου, γεγονός που διεγείρει τη σύνθεση και απελευθέρωση αλδοστερόνης (17). Παρομοίως, αυξημένα επίπεδα εξωκυττάρια καλίου διαταράσσουν το δυναμικό ενέργειας στην κυτταρική μεμβράνη αυξάνοντας έτσι την είσοδο του

ασβεστίου στο κύτταρο μέσω των καναλιών ασβεστίου (19). Η φωσφορυλίωση, από τις calmodulin-dependent protein kinases II ή CaM κινάσες II, παραγόντων που παραμένουν ακόμα αδιευκρίνιστοι αυξάνει την μεταγραφή της συνθετάσης αλδοστερόνης, (CYP11B2), ένα ένζυμο απαραίτητο για την βιοσύνθεση της Αλδοστερόνης (16). Τα καθοριστικά στάδια που επηρεάζουν την έκφραση της 21- Υδροξυλάσης στη σπειροειδή ζώνη παραμένουν αδιευκρίνιστα (5).

Γ. Διαταραχή της στεροειδογένεσης λόγω έλλειψης της 21- Υδροξυλάσης

Η πλέον χαρακτηριστική βιοχημική διαταραχή στην έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης είναι τα αυξημένα επίπεδα της 17-υδροξυπρογεστερόνης (17-ΟΗΠ), το κατεξοχήν υπόστρωμα του ενζύμου. Τα βασικά επίπεδα της 17-ΟΗΠ στον ορό πασχόντων συνήθως ξεπερνούν την τιμή των 10,000 ng/dl ή 300 nmol/l, παρόλο που σε ποσοστό 10% των σοβαρά πάσχοντων νεογνών ενδέχεται να έχουν χαμηλές τιμές, ιδιαίτερα όταν το αίμα ληφθεί την πρώτη μέρα της ζωής (20). Η διαφορική διάγνωση της έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης από τις άλλες μορφές της ΣΥΕ στηρίζεται σε κλινικά και βιοχημικά ευρήματα όπως φαίνονται στον πίνακα 2 (5). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι χωρίς ένα πλήρες ορμονικό προφίλ των επινεφριδιακών στεροειδών από αξιόπιστο εργαστήριο, άλλες ενζυματικές διαταραχές όπως έλλειψη των 3β-HSD και 11β-υδροξυλάσης ενδέχεται να διαγνωσθούν εσφαλμένα ως έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης, γεγονός που έχει αντίκτυπο στη θεραπευτική αντιμετώπιση αφού οι ασθενείς με έλλειψη της 11β-υδροξυλάσης είναι συνήθως υπερτασικοί (20, 21).

Πίνακας 2. Μορφές Συγγενούς Υπερπλασίας Επινεφριδίων

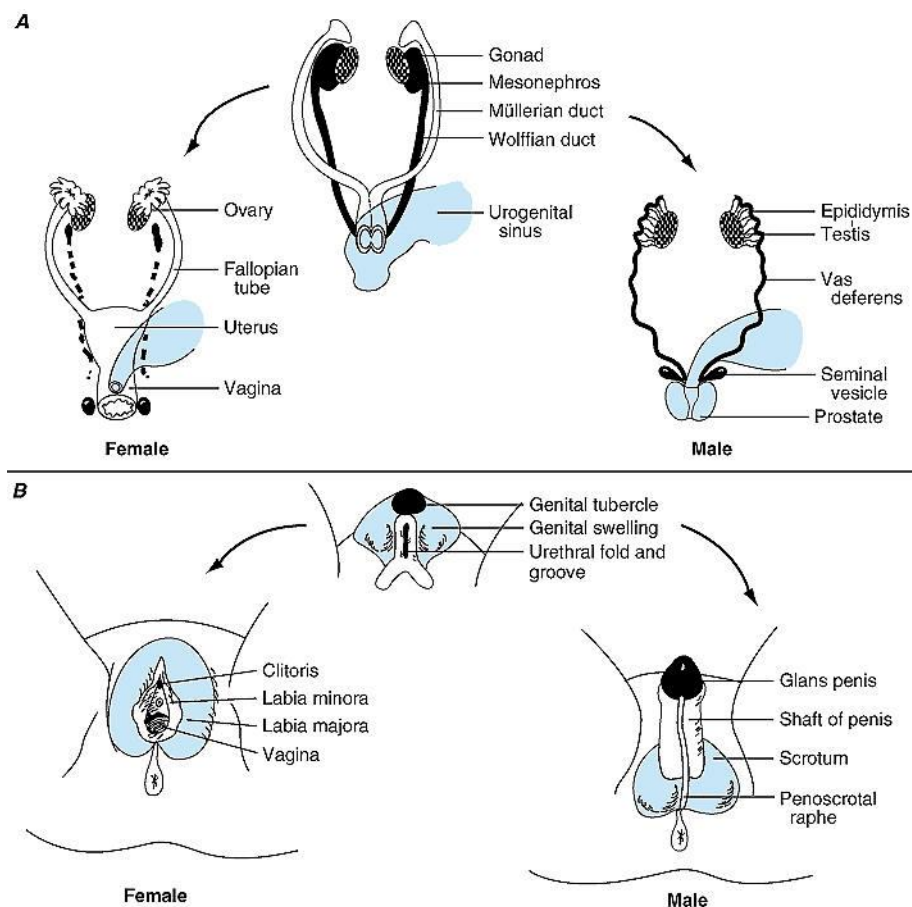
Νόσος	έλλειψη 21-Υδροξυλάσης	έλλειψη 11 β-Υδροξυλάσης	έλλειψη συνθετάσης της Αλδοστερόνης	έλλειψη 17α-Υδροξυλάσης	έλλειψη 3β-Υδροξυστεροειδικής δευδρογενάσης	Λιποειδής Υπερπλασία
Γονίδιο	CYP21	CYP11B1	CYP11B2	CYP17	HSD3B2	STAR
Αμφίβολα γεννητικά όργανα	+ σε ♀	+ σε ♀	Όχι	+ σε ♂ Απουσία εφηβείας σε ♀	+ σε ♂ ήπια σε ♀	+ σε ♂ Απουσία εφηβείας σε ♀
Επινεφριδιακή κρίση	+	Σπάνια	Μόνο απώλεια άλατος	Όχι	+	++
Συχνότητα	1:10-18,000	1:100,000	Σπάνια	Σπάνια	Σπάνια	Σπάνια
Γλυκοκορτικοειδή	↓	↓	Φυσιολογικά	↓	↓	↓
Αλατοκορτικοειδή	↓	↑	↓	↑	↓	↓
Ανδρογόνα	↑	↑	Φυσιολογικά	↓	↓ σε ♂	↓
Αρτηριακή πίεση	↓	↑	↓	↑	↓	↓
Νάτριο	↓	↑	↓	↑	↓	↓
Κάλιο	↑	↓	↑	↓	↑	↑
Αυξημένοι μεταβολίτες	17-ΟΗΠ	DOC, 11-δεοξυκορτιζόλη	Κορτικοστερόνη, ±18-υδροξυκορτικοστερόνη	DOC Κορτικοστερόνη	DHEA, 17Δ ⁵ Πρεγνενολόνη	Κανένας

Τα υψηλότερα επίπεδα 17-ΟΗΠ (μέχρι και 100,000 ng/dl ή 3000 nmol/l μετά από διέγερση με ACTH IV) παρατηρούνται σε ασθενείς που έχουν τη μορφή ΣΥΕ με απώλεια άλατος, ενώ σχετικά χαμηλότερα επίπεδα βρίσκονται στους ασθενείς με την απλή αρρενοποιητική μορφή, παρόλο που συχνά υπάρχει επικάλυψη (21). Στην ηπιότερη μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ δεν παρατηρούνται τόσο υψηλά επίπεδα της 17 – ΟΗΠ ιδιαίτερα στη νεογνική περίοδο, έτσι που η διάγνωση να τίθεται από την απάντηση της 17 – ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH (22). Τυχαία μέτρηση, ιδίως μη πρωινή, της βασικής τιμής 17 – ΟΗΠ μπορεί να είναι φυσιολογική σε ασθενείς με την μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ. Οι σύνθετοι ετεροζυγώτες με μεταλλάξεις κλασσικής και μη κλασσικής μορφής έχουν υψηλότερες τιμές διεγερμένης με ACTH 17 – ΟΗΠ συγκριτικά με αυτούς οι οποίοι φέρουν και τις δύο μεταλλάξεις της μη κλασσικής μορφής (23). Τα επίπεδα της 17 – ΟΗΠ δεν είναι τόσο διαγνωστικά στους ετεροζυγώτες επειδή παρατηρείται επικάλυψη με αυτά του γενικού πληθυσμού και αυτών που δεν έχουν καμία μετάλλαξη, έτσι που να είναι πιο καθοριστικός για τη διάγνωση ο λόγος 17-ΟΗΠ προς Κορτιζόλη (24). Οι άλλες ορμόνες που είναι αυξημένες στην ΣΥΕ είναι η Προγεστερόνη, Ανδροστενεδιόνη, 21-Δεοξυκορτιζόλη και σε μικρότερο βαθμό η Τεστοστερόνη, ενώ η DHEA, το κύριο C19 παράγωγο των επινεφριδίων, δεν αποτελεί καλό δείκτη της δραστηριότητας της 21-Υδροξυλάσης (25).

3. Παθοφυσιολογία της ΣΥΕ

A. Σεξουαλική διαφοροποίηση

Η αδιαφοροποίητη αμφιδύναμη γονάδα εξελίσσεται σε όρχι ή ωοθήκη γύρω στην 7^η εβδομάδα της κύησης αφού ακολουθήσει τις οδηγίες από διάφορα καθοριστικά γονίδια όπως SRY, SOX-9, DAX1, R-spondin και WNT-4 (26-28). Οι ωοθήκες αναγνωρίζονται γύρω στην 10^η εβδομάδα. Τα έσω γεννητικά όργανα (σάλπιγγες, μήτρα, τράχηλος και άνω μέρος του κόλπου) στο θήλυ έμβρυο εξελίσσονται από τους πόρους του Müller λόγω απουσίας της ανασταλτικής anti-Müllerian hormone (AMH), η οποία συντίθεται από τα κύτταρα Sertoli του όρχεως (29). Αντιθέτως η εξέλιξη των πόρων του Wolff σε έσω γεννητικά όργανα άρρενος (επιδιδυμίδα, σπερματικός πόρος, εκφορητικές οδοί, σπερματικά σωληνάρια) απαιτεί την παρουσία Τεστοστερόνης η οποία παράγεται από τα κύτταρα Leydig του όρχεως από την 7^η εβδομάδα της κύησης. Επί απουσίας Τεστοστερόνης οι πόροι του Wolff υποστρέφουν. Τα αμφιδύναμα έξω γεννητικά όργανα στα αρχικά στάδια της κύησης διαφοροποιούνται σε άρρενα με την δράση της 5α-Διυδροτεστοστερόνης (ΔΗΤ) στον ακέραιο ανδρογονικό υποδοχέα (11, 30). Η όλη πορεία της σεξουαλικής διαφοροποίησης απεικονίζεται στην εικόνα 5 (http://www.gfmer.ch/Cours/Normal_sexual_differentiation.htm).



Εικόνα 5. Σεξουαλική διαφοροποίηση έσω και έξω γεννητικών οργάνων

B. Εμβρυολογία των επινεφριδίων

Ο φλοιός των επινεφριδίων δημιουργείται από το μεσόδερμα την 4^η εβδομάδα της κύησης. Η παραγωγή στεροειδών ενδομητρίως παρατηρείται περί την 6^η με 7^η εβδομάδα, από την προσωρινή ζώνη του λειτουργικού επινεφριδιακού φλοιού (31). Ο μόνιμος επινεφριδιακός φλοιός δημιουργείται την 9^η με 10^η εβδομάδα. Μέχρι το τέλος της κύησης αναπτύσσει τις τρεις επινεφριδιακές ζώνες και αποκτά πλήρη στεροειδική λειτουργία μετά από την δράση διαφόρων γονιδίων και μεταγραφικών παραγόντων όπως Steroidogenic factor-1 και DAX-1 (32, 33).

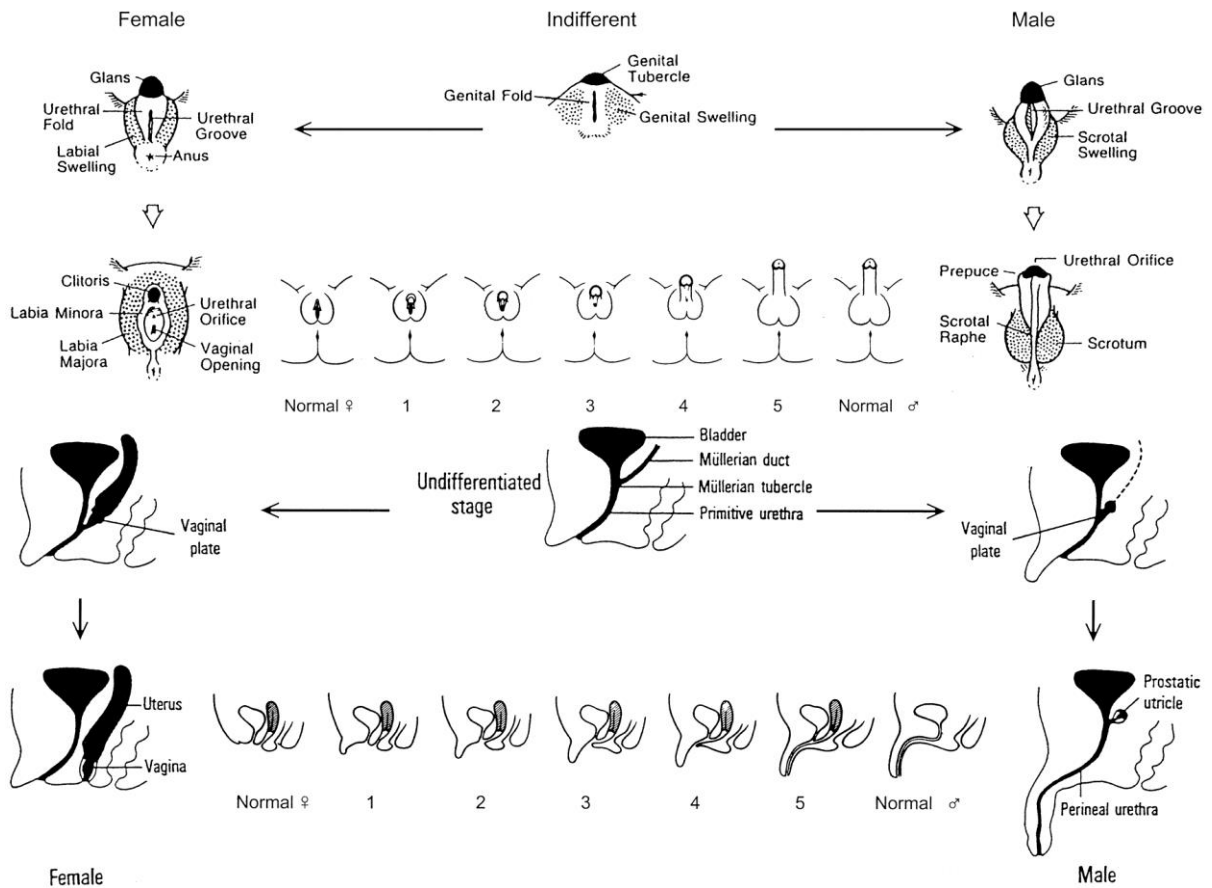
Η ανάπτυξη του εμβρυικού επινεφριδίου ρυθμίζεται πρωταρχικά από την εμβρυική ACTH, η οποία δρα με αυτοκρινικό/παρακρινικό τρόπο. Η δράση αυτή ρυθμίζεται από διάφορους αυξητικούς παράγοντες όπως: ο επιδερμικός αυξητικός παράγων (Epidermal Growth Factor - EGF), ο βασικός αυξητικός παράγων των ινοβλαστών (basic Fibroblast Growth Factor - bFGF), η χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), οι ινσουλινόμορφοι αυξητικοί παράγοντες (Insulin Growth Factors - IGF-I και IGF-II), και ο αυξητικός παράγων μετατροπής β (34).

Ανατομικά και φυσιολογικά δεδομένα καταδεικνύουν ότι ο άξονας υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια είναι ανενεργός μέχρι την 8^η εβδομάδα κύησης. Ωστόσο η εμπειρία με την χορήγηση δεξαμεθαζόνης στην έγκυο που πιθανόν να κυοφορεί πάσχον με ΣΥΕ έμβρυο με στόχο την αποφυγή αρρενοποίησης πάσχοντα θήλεος εμβρύου συνηγορεί για άλλους μηχανισμούς δράσης όπως από ένα άλλο ACTH-ανεξάρτητο παλίνδρομο γλυκοκορτικοειδές μονοπάτι υπεύθυνο για την παραγωγή επινεφριδιακών στεροειδών ή ακόμα και λόγω άμεσης καταστολής σε επινεφριδιακό επίπεδο (5).

Γ. Προγεννητική αρρενοποίηση

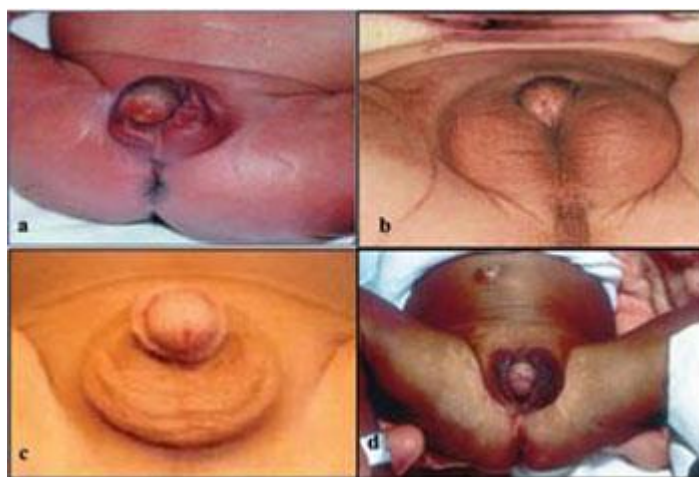
Στα θήλεα πάσχοντα από ΣΥΕ έμβρυα ο ουρογεννητικός σωλήνας βρίσκεται στο στάδιο του διαχωρισμού όταν το επινεφρίδιο αρχίζει να υπερπαραγάγει ανδρογόνα, των οποίων τα επίπεδα είναι επαρκή ώστε να εμποδίσουν τον σχηματισμό του κολπικού σωλήνα και της ουρήθρας. Επιπρόσθετη εμπλοκή στη φυσιολογική ανατομία του θήλεος συμβαίνει όταν τα επινεφριδιακά ανδρογόνα αντιδρούν με τους ανδρογονικούς υποδοχείς του δέρματος των έξω γεννητικών οργάνων με αποτέλεσμα την μεγέθυνση της κλειτορίδας, σύγκλιση των χειλεϊκών πτυχών

και μετανάστευση του στομίου της ουρήθρας. Τα έσω γεννητικά όργανα που εκπορεύονται από του πόρους του Wolf δεν αρρενοποιούνται πιθανώς επειδή απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση Τεστοστερόνης (35). Το τυπικό αποτέλεσμα στην σοβαρή μορφή της ΣΥΕ είναι το θήλυ νεογνό που προβάλλει με αμφίβολα γεννητικά όργανα ή ακόμα και με πλήρη αρρενοποίηση, προσομοιάζουσα με άρρεν νεογνό με περινεϊκό υποσπαδίας, χορδή και κρυφορχία (36). Τα πάσχοντα θήλεα νεογνά ταξινομούνται για τη σοβαρότητα της αρρενοποίησης με την κλίμακα Prader, υψίστης χειρουργικής και όχι μόνο σημασίας (37) - εικόνα 6 (<http://edrv.endojournals.org/content/21/3/245/F3.expansion>).



Εικόνα 6. Ταξινόμηση βαθμού αρρενοποίησης με την κλίμακα Prader

Ο βαθμός αρρενοποίησης διαφέρει σημαντικά ανάμεσα στα πάσχοντα νεογνά ίσως γιατί η φυσική δράση της υπερανδρογοναιμίας εξαρτάται και από τον βαθμό μετατροπής σε πιο δραστικά ανδρογόνα όπως η ΔΗΤ από το περιφερικό ένζυμο 5α-ρεδουκτάση και ακόμα από την συγκέντρωση και την μεταγραφική ικανότητα των ανδρογονικών υποδοχέων (38). Ένα ακόμα αποτέλεσμα της προγεννητικής έκθεσης στα ανδρογόνα είναι το αυξημένο μήκος γέννησης τόσο στα άρρενα όσο και στα θήλεα πάσχοντα νεογνήνητα (39). Η κλινική προβολή της αρρενοποίησης του θήλεος εμβρύου και η ομοιότητα με άλλες διαταραχές της σεξουαλικής διαφοροποίησης φαίνεται στην εικόνα 7 (28).



Εικόνα 7. a. 46,XX νεογνό με ΣΥΕ b. 46, XY νεογνό με μερική αντίσταση στους υποδοχείς των ανδρογόνων c. 46,XX νεογνό με ΣΥΕ και πλήρη σύγκλιση των χειλεοσχαικών πτυχών d. 46, XY νεογνό με αμφω κρυφορχία και υποσπαδία (προσωπικό αρχείο)

Δ. Απώλεια άλατος

Σε ποσοστό 75 % οι ασθενείς με τη κλασσική μορφή της ΣΥΕ αδυνατούν να συνθέσουν Αλδοστερόνη, λόγω μη της 21 – υδροξυλίωσης της Προγεστερόνης. Η Αλδοστερόνη είναι αναγκαία για την ομοιοστασία του Νατρίου, έτσι που όταν απουσιάζει να παρατηρείται απώλεια Νατρίου από τους νεφρούς, το κόλον και τους ιδρωτοποιούς αδένες (40). Η συνυπάρχουσα έλλειψη Κορτιζόλης επιδεινώνει τις συνέπειες της απουσίας της Αλδοστερόνης, λόγω μείωσης του καρδιακού κλάσματος εξόδου και μείωσης της νεφρικής διήθησης, οδηγώντας έτσι στην ανικανότητα απέκρισης του ελεύθερου ύδατος με συνέπεια την υπονατριαιμία που συχνά οδηγεί σε καταπληξία (41, 42). Επιπρόσθετα, τα πρόδρομα στεροειδή, τα οποία αθροίζονται λόγω της ενζυματικής έλλειψης, ανταγωνίζονται τα αλατοκορτικοειδή στη δέσμευση με τους υποδοχείς των αλατοκορτικοειδών, ιδίως σε αθεράπευτους ασθενείς (43).

Η μορφή με απώλεια άλατος μπορεί να προβάλλει με μη ειδικά συμπτώματα όπως : άρνηση λήψης τροφής, έμετοι, λήθαργος και ανεπαρκής πρόσληψη βάρους. Η κλινική εκδήλωση παρατηρείται στην πρώτη με τέταρτη εβδομάδα ζωής με υπονατριαιμία, υπερκαλιαιμία, και υποογκαιμική καταπληξία, η οποία είναι απειλητική για τη ζωή αν δεν τύχει θεραπείας. Τα θήλεα πάσχοντα νεογνά με τη μορφή με απώλεια άλατος αυτονόητα παρουσιάζουν αμφίβολα γεννητικά όργανα. Το γεγονός αυτό μπορεί ευτυχώς να οδηγήσει σε διάγνωση της νόσου πριν εκδηλωθεί η υπονατριαιμία. Το πρόβλημα είναι ιδιαίτερα σοβαρό στα αρρενα πάσχοντα νεογνά επειδή, σε αντίθεση με τα θήλεα, στερούνται της

κλινικής προβολής κατά τη γέννηση, εκτός από την εκσεσημασμένη υπέρχρωση του οσχέου και δεν διαγιγνώσκονται πριν εμφανίσουν κρίση απώλειας άλατος (44). Η αυξημένη θνητότητα σε αυτές τις περιπτώσεις έχει οδηγήσει πολλές χώρες να συμπεριλάβουν στα ανιχνευτικά προγράμματα νεογνών και τη μέτρηση της 17 – ΟΗΠ για έγκαιρη ανίχνευση της ΣΥΕ.

Είναι αξιοσημείωτο ότι ασθενείς, οι οποίοι φέρουν πανομοιότυπη μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* δεν παρουσιάζουν στον ίδιο βαθμό απώλεια άλατος πιθανώς γιατί επηρεάζονται και από επιπρόσθετους γενετικούς και όχι μόνο παράγοντες (45). Επιπρόσθετα, ασθενείς με ΣΥΕ που έχουν σοβαρά επεισόδια απώλειας άλατος κατά την βρεφική και παιδική ηλικία βελτιώνουν την ομοιόσταση του Νατρίου με την πάροδο της ηλικίας.

E. Σημεία υπερανδρογοναιμίας μετά τη γέννηση

Η συνεχής παραγωγή επινεφριδιακών ανδρογόνων μετά τη γέννηση σε παιδιά που είναι εντελώς ή ατελώς αθεράπευτα δημιουργεί αρκετά προβλήματα. Τα αγόρια παρουσιάζουν επιτάχυνση της αύξησης, η οποία συνοδεύεται από επιτάχυνση της οστικής ωρίμανσης, εμφάνιση τρίχωσης στο εφήβαιο και αύξηση του μεγέθους του πέους χωρίς αύξηση του όγκου των όρχεων που εμφανίζονται κυρίως μετά τους 18 μήνες ζωής (46). Τα κορίτσια παρουσιάζουν επιπλέον προοδευτική αύξηση του μεγέθους της κλειτορίδας ενώ στην εφηβεία προστίθενται σημεία υπερανδρογοναιμίας όπως ακμή, δασυτρυχισμός και ωθητική δυσλειτουργία. Το τελικό ανάστημα των παιδιών επηρεάζεται αρνητικά είτε λόγω επιτάχυνσης της οστικής ωρίμανσης είτε λόγω υπερθεραπείας με κορτικοειδή, η οποία οδηγεί σε καταστολή της αύξησης (47).

Παρατηρείται αξιοσημείωτη διαφορά ανάμεσα στα προ και μετά την γέννηση κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας στα πάσχοντα παιδιά, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στις διαφορές στα απόλυτα επίπεδα των πρόδρομων επινεφριδιακών στεροειδών ή ακόμα και στην επάρκεια μετατροπής τους σε ισχυρά ανδρογόνα. Διαφορές επίσης στην έκφραση ή στη δραστικότητα του ανδρογονικού υποδοχέα πιθανόν να συμβάλλουν στον κλινικό φαινότυπο.

Στ. Αναπαραγωγική ικανότητα στην κλασσική μορφή της ΣΥΕ

Τα προβλήματα αναπαραγωγής στις γυναίκες με την κλασσική μορφή της ΣΥΕ γίνονται αντιληπτά στη εφηβεία, όπου η ηλικία εμμηναρχής σε ατελώς θεραπευθέντα κορίτσια είναι καθυστερημένη (48). Οι γυναίκες με ΣΥΕ συχνά εκδηλώνουν κλινική εικόνα παρόμοια με αυτή του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών με ανωορρηξία, δασυτρυχισμό και απεικονιστικά ευρήματα πολλαπλών κύστεων (άρρηκτα ωοθυλάκια) στην ωοθήκη (49). Επιπλέον, σε γυναίκες με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ παρατηρείται σημαντική μείωση της ευαισθησίας της Ινσουλίνης συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες (50).

Υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για την εξήγηση του φαινομένου αυτού, όπως η επίδραση της Ανδροστενεδιόνης στην υποθαλαμική παραγωγή της Εκλυτικής ορμόνης της Ωχρινοτρόπου ορμόνης - LHRH, η παρεμπόδιση της κυκλικότητας από την προγεστρόνη, η άμεση τοξικότητα των ανδρογόνων στην ωοθήκη και η δυσλειτουργία της ωοθήκης που προγραμματίζεται ενδομήτρια από τον υποθάλαμο, λόγω αυξημένων επιπέδων στεροειδών (5). Η πλειονότητα βέβαια των πάσχοντων εφήβων εμφανίζει εμμηναρχή. Ωστόσο, η ανάπτυξη των μαζικών

αδένων επηρεάζεται αρνητικά προφανώς λόγω υπερέκκρισης ανδρογόνων και της συνυπάρχουσας έλλειψης της Κορτιζόλης (51).

Κατά τη διάρκεια της κύησης οι πάσχουσες με ΣΥΕ ρυθμίζονται ικανοποιητικά με προσαρμογή της δόσης της Υδροκορτιζόνης ή Πρεδνιζόνης, σκευάσματα τα οποία δεν διέρχονται από τον πλακούντα (52). Παρά την υπάρχουσα υπερανδρογοναιμία στη μητέρα, το θήλυ μη πάσχον νεογνό δεν αρρενοποιείται, πιθανώς λόγω αρωματοποίησης των στεροειδών από τον πλακούντα και παρεμπόδισής τους να επηρεάσουν το έμβρυο ή λόγω αυξημένων επιπέδων της μητρικής δεσμευτικής πρωτεΐνης των φυλετικών ορμονών – Sex Hormone Binding Globulin [SHBG] και συνεπώς μείωσης του ελεύθερου δραστικού κλάσματος των ανδρογόνων (53).

Οι άνδρες με ΣΥΕ παρουσιάζουν λιγότερο συχνά μείωση της λειτουργίας των γονάδων σε σχέση με τις γυναίκες. Στην πλειονότητά τους έχουν φυσιολογικό σπερμοδιάγραμμα και είναι ικανοί να γίνουν πατέρες (54). Η ακεραιότητα του όρχεως παρατηρείται και στους πάσχοντες με την απλή αρρενοποιητική μορφή της ΣΥΕ ακόμα και όταν δεν λαμβάνουν θεραπεία (55). Μία εμφανής όμως επιπλοκή στους άρρενες πάσχοντες, ιδίως στους ατελώς θεραπευμένους είναι η ανάπτυξη έκτοπου επινεφριδιακού ιστού στους όρχεις (56).

H. Νευροφυσιολογία της ΣΥΕ

Επίδραση στην ταυτότητα του φύλου

Η ανάπτυξη της προσωπικότητας λόγω της ορμονικής και όχι μόνο έκθεσης του εγκεφάλου προγεννητικά παραμένει αινιγματική (57). Ο ρόλος του φύλου (gender role) αναφέρεται στις στερεότυπες συμπεριφορές του κάθε φύλου, όπως είναι επιλογή του είδους του παιχνιδιού κατά την παιδική ηλικία. Σε κάποιες μελέτες τα κορίτσια με ΣΥΕ έχουν προτίμηση στα αγορίστικα παιχνίδια αντί να παίζουν με τις κούκλες και αργότερα σαν έφηβες και γυναίκες έχουν μειωμένο ενδιαφέρον για μητρότητα (58, 59). Κάποιες άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τόσο τα κορίτσια όσο και οι γυναίκες με ΣΥΕ δεν διαφέρουν στην ψυχοπαθολογία – επιθετικότητα, υπερδραστηριότητα - από τα άλλα κορίτσια ή γυναίκες αντίστοιχα (60, 61). Η αμυγδαλή είναι ένα ανδρογονοευαίσθητο εγκεφαλικό κέντρο το οποίο ελέγχει τον φόβο και την επιθετικότητα. Παρόλο ότι έχει βρεθεί με MRI να είναι μικρότερη σε παιδιά με ΣΥΕ, εντούτοις δεν έχει άμεσα συσχετισθεί με τις ψυχολογικές δοκιμασίες (62).

Σε σημαντικό ποσοστό πασχόντων γυναικών έχει παρατηρηθεί διαφορά στον σεξουαλικό προσανατολισμό ιδίως σε αυτές που πάσχουν με την μορφή με απώλεια άλατος ΣΥΕ, οι οποίες φαίνεται σε αυξημένο συγκριτικά βαθμό να έχουν ομοφυλόφιλη ή αμφιφυλόφιλη σεξουαλική δραστηριότητα. Άλλες μελέτες δεν τεκμηριώνουν το φαινόμενο αυτό, δείχνουν ωστόσο μειωμένη συζυγική ζωή και μητρότητα αναδεικνύοντας μια πιο γενική ψυχολογική δυσλειτουργία (63).

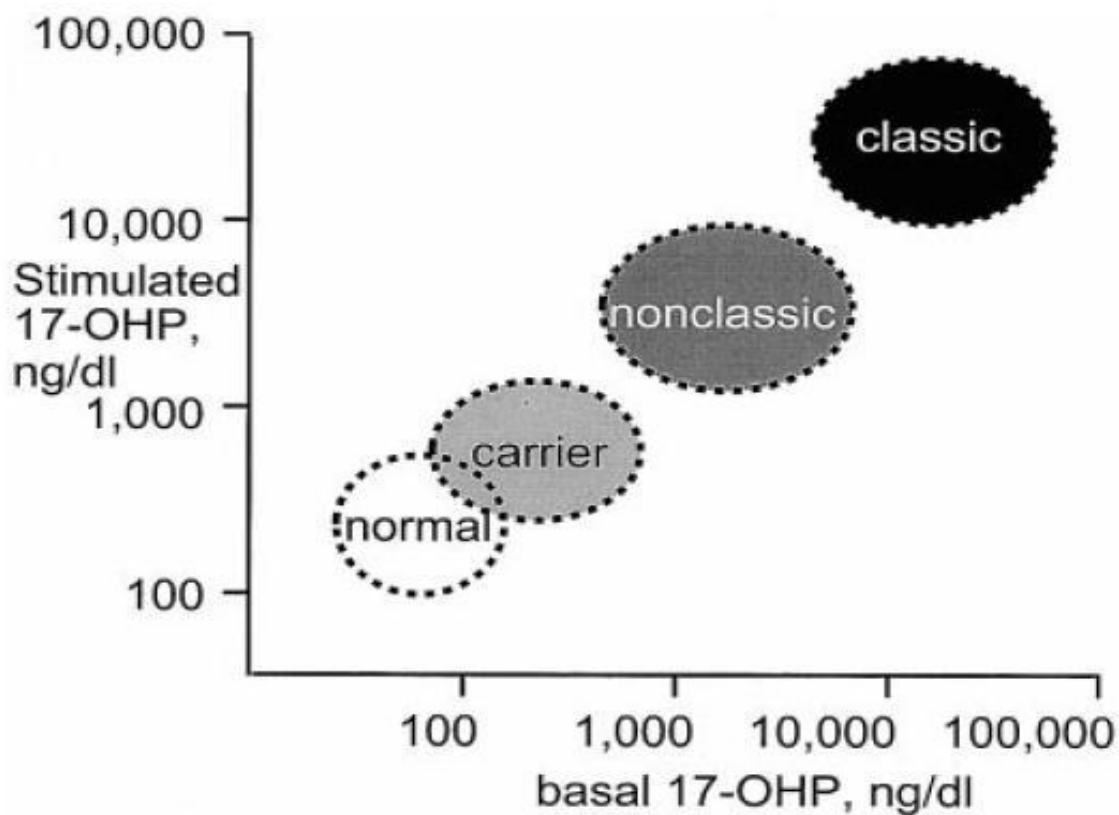
Διαταραχή στην ταυτότητα του φύλου και αυτοπροσδιορισμός ως άρρεν παρατηρείται σπάνια στις γυναίκες με ΣΥΕ (64). Συνήθως συμβαίνει όταν καθυστερήσει ο καθορισμός του φύλου ή η χειρουργική διόρθωση ή όταν δεν καταστέλλονται επαρκώς, ενίοτε εσκεμμένα από τις ασθενείς τα ανδρογόνα με την θεραπεία (65). Σε κάποιες κοινωνίες χωρών του τρίτου κόσμου κοριτσάκια με σοβαρού βαθμού αρρενοποίηση έχουν μεγαλώσει σαν αγόρια και παρέμειναν στο άρρεν φύλο (66). Δεν φαίνεται να υπάρχει διαφορά στην ψυχοσεξουαλική προσαρμογή και λειτουργία ανάμεσα στα σοβαρού βαθμού αρρενοποιημένα παιδιά που έχουν μεγαλώσει ως άνδρες ή γυναίκες (1, 67).

4. Μη κλασσική μορφή ΣΥΕ

A. Κλινικά σημεία

Οι πάσχοντες με την ήπια μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ ενδέχεται να παρουσιάζουν σημεία έκθεσης στα ανδρογόνα μετά τη γέννηση. Τα θήλεα πάσχοντα νεογνά δεν παρουσιάζουν αμφίβολα γεννητικά όργανα εκτός από μερικές φορές μια ήπια αύξηση του μεγέθους της κλειτορίδας (22). Τα επίπεδα της 17 – ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH είναι συνήθως υψηλότερα από 1,000 ng/dl ή 30 nmol/l, ενώ η βασική τιμή αν δεν είναι πρωινή μπορεί να είναι στα φυσιολογικά όρια λόγω του κίρκαδιανού ρυθμού (68). Για την εργαστηριακή διάγνωση της μη κλασσικής μορφής με βάση την απάντηση της 17 – ΟΗΠ στη διέγερση με ACTH χρησιμοποιείται το νορμόγραμμα, όπου τοποθετούνται οι δύο

τιμές (βασική και μετά από διέγερση) της 17 – ΟΗΠ όπως φαίνεται στην εικόνα 8 (http://bigtomato.org/endo/adrenal/cah_21.php).



Εικόνα 8. Νορμόγραμμα με την βασική και μετά από διέγερση με ACTH τιμή της 17 – ΟΗ Προγεστερόνης στις διάφορες μορφές ΣΥΕ.

Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων και κλινικών σημείων ποικίλλει, ενώ υπάρχουν πλήρως ασυμπτωματικοί πάσχοντες. Τα πιο συνήθη κλινικά σημεία είναι η πρόωμη αδρεναρχή στη παιδική ηλικία, και ολιγομηνόρροια με δασυτρυχισμό στην έφηβο και στη γυναίκα ή ακόμα απλώς προβλήματα στην επίτευξη γονιμοποίησης (68-70).

Οι πάσχοντες άρρενες συνήθως παραμένουν αδιάγνωστοι και εντοπίζονται στις μελέτες των οικογενειών. Μπορεί ωστόσο να προβάλουν με πρόωμη αδρεναρχή ή μετά την εφηβεία με σοβαρή ακμή και αδυναμία γονιμοποίησης (69). Ο διαχωρισμός ανάμεσα στην ήπια απλή αρρενοποιητική μορφή και τη σοβαρή μη κλασσική μορφή στα αγόρια είναι μερικές φορές δύσκολος λόγω των μη εμφανών κλινικών σημείων και της επικάλυψης στα επίπεδα της 17 – ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH. Η σύνθεση της Αλδοστερόνης και Κορτιζόλης παραμένει ακέραια ακόμα και σε καταστάσεις στρες (71).

Η δυσκολία αναπαραγωγής στις γυναίκες με την μη κλασσική μορφή είναι σαφώς ηπιότερη από αυτή που παρατηρείται στις γυναίκες με την κλασσική μορφή παρόλο που η παθοφυσιολογία είναι παρόμοια. Οι γυναίκες με τη μη κλασσική μορφή εντοπίζονται σε σημαντικό ποσοστό στις κλινικές γονιμότητας, ένας σημαντικός αριθμός γυναικών που έφεραν υποχρεωτικά και τις δύο μεταλλάξεις ωστόσο δεν είχαν απολύτως κανένα πρόβλημα γονιμοποίησης και ανιχνεύτηκαν στις μελέτες οικογενειών πασχόντων (72, 73).

B. Συχνότητα

Η μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ θεωρείται η πιο συχνή ενδοκρινοπάθεια και η πιο συχνή κληρονομική πάθηση στον άνθρωπο που μεταβιβάζεται με υπολειπόμενο αυτόσωμο χαρακτήρα. Λόγω απουσίας συμπτωμάτων στους άρρενες πάσχοντες υπάρχει δυσκολία στον υπολογισμό των συχνοτήτων των αλληλίων και της νόσου (74). Η συχνότητα της νόσου υπολογίζεται σε 0.1% στον γενικό πληθυσμό αλλά παρατηρείται σε 1–2% στους Ισπανούς και Γιουγκοσλάβους και σε 3–4% στους Εβραίους Ashkenazi (75). Σε ανιχνευτικά προγράμματα μοριακού ελέγχου νεογνών στη Νέα Ζηλανδία έχει βρεθεί ότι ποσοστό 5% των νεογνών είναι φορείς κάποιας μετάλλαξης του γονιδίου *CYP21A1*, έτσι που η συχνότητα της μη κλασσικής μορφής να υπολογίζεται σε 0.06% (76). Σε αντιδιαστολή ένα μικρό ποσοστό 4 – 7 % παιδιών με πρώιμη αδρεναρχή και γυναικών με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας είχαν την διάγνωση της μη κλασσικής μορφής που οφείλεται σε έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης (77, 78).

Γ. Ετεροζυγώτες

Οι ετεροζυγώτες που φέρουν μια μόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* έχουν ελαφρώς αυξημένη τιμή της 17 – ΟΗΠ (300 –1,000 ng/dl ή 10-30 nmol/l) μετά από διέγερση με ACTH με σημαντική όμως επικάλυψη με τους υγιείς μάρτυρες (22). Σε 53 γυναίκες με σημεία υπερανδρογοναιμίας στις οποίες υπήρχε υποψία να φέρουν μετάλλαξη στο γονίδιο λόγω αυξημένης 17 – ΟΗΠ, τέτοιες μεταλλάξεις ανιχνεύθηκαν μόνο σε 37 από αυτές, ενώ εντοπίστηκαν σε 15 από 16 γυναίκες με επίπεδα 17 – ΟΗΠ ή 21 – δεοξυκορτιζόλης που αναμένονταν να βρεθούν στη

μη κλασσική μορφή (79). Η γονοτυπική ανάλυση σαφώς φαίνεται να υπερέχει έναντι του ορμονικού προσδιορισμού στον εντοπισμό των ετεροζυγωτών.

Οι μητέρες παιδιών με τη κλασσική μορφή ΣΥΕ, που είναι υποχρεωτικά ετερόζυγες, παρουσιάζουν πιο συχνά σημεία υπερανδρογοναιμίας. Επιπλέον, παρατηρείται αυξημένη συχνότητα ετεροζυγωτίας με μεταλλάξεις του *CYP21A2* σε παιδιά με πρώιμη αδρεναρχή ή έφηβες με δασυτρυχισμό (80, 81). Εικάζεται ότι με την υπολογιζόμενη συχνότητα ετεροζυγωτών 10% για τη μη κλασσική μορφή και 1.5% για την κλασσική μορφή στον γενικό πληθυσμό είναι απίθανο για την ετεροζυγωτία να αποτελεί μειονέκτημα στην αναπαραγωγική ικανότητα.

5. Διάγνωση της έλλειψης 21-Υδροξυλάσης

A. Αμφίβολα γεννητικά όργανα

Η αντιμετώπιση του νεογνού με αμφίβολα γεννητικά όργανα αποτελεί ιατρική πρόκληση και πρέπει να αντιμετωπίζεται με υπευθυνότητα και ευαισθησία γιατί ο καθορισμός του φύλου ανατροφής του παιδιού έχει αντίκτυπο σε όλη του τη ζωή. Έτσι όσο πιο σύντομα τεθεί η διάγνωση και επομένως η ορθολογιστική απόφαση του φύλου ανατροφής από την ιατρική ομάδα τόσο πιο εύκολο θα είναι για την οικογένεια να αντιμετωπίσει το πρόβλημα. Κυρίως όμως θα αποφευχθούν οι μακροχρόνιες επιζήμιες ψυχολογικές επιπτώσεις στο παιδί. Με τις σύγχρονες μεθόδους εργαστηριακής διερεύνησης οι απαραίτητες πληροφορίες για την σύνθεση των χρωμοσωμάτων και για τη φύση των έσω γεννητικών οργάνων λαμβάνονται μέσα σε 24 με 48 ώρες (82).

Η κλινική εικόνα του πάσχοντος με την κλασσική μορφή ΣΥΕ θήλεος νεογνού ποικίλλει και ο βαθμός αρρενοποίησης διαφέρει από απλή μεγέθυνση κλειτορίδος μέχρι την πλήρη αρρενοποίηση. Η φυσική εξέταση θα αποκαλύψει την παρουσία κοινής εκβολής του ουρογεννητικού σωλήνα και την απουσία γονάδων στους βουβωνικούς πόρους ή στις χειλεοοσχεικές πτυχές. Η εκσεσημασμένα υψηλή τιμή της 17 – ΟΗΠ μαζί με τις υψηλές τιμές Ανδροστενεδιόνης, Τεστοστερόνης και ACTH είναι παθογνωμονική για την διάγνωση της έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης. Το πλήρες ορμονικό προφίλ των επινεφριδιακών στεροειδών είναι απαραίτητο για τον αποκλεισμό των άλλων ενζυματικών διαταραχών. Η νοσηλεία του νεογνού είναι αναγκαία για παρακολούθηση των ζωτικών σημείων και έγκαιρη διάγνωση ηλεκτρολυτικών διαταραχών και επικείμενης επινεφριδιακής κρίσης η οποία παρατηρείται στην μορφή με απώλεια άλατος μεταξύ 1^{ης} και 4^{ης} εβδομάδας ζωής (81-83).

Το θήλυ πάσχον με ΣΥΕ νεογνό έχει φυσιολογικό θήλυ καρυότυπο 46, XX και στον υπερηχογραφικό έλεγχο εμφανίζει γυναικεία εξαρτήματα (μήτρα, ωθήκες). Επί ενδείξεων ακτινογραφική απεικόνιση με σκιαγραφικό θα αποκαλύψει τη φύση της ανατομίας του ουρογεννητικού σωλήνα και θα βοηθήσει στον προγραμματισμό μελλοντικών χειρουργικών διορθώσεων. Η ιατρική ομάδα που αντιμετωπίζει το παιδί πλαισιώνεται από παιδίατρο, παιδοενδοκρινολόγο, ουρολόγο, γενετιστή και ψυχίατρο οι οποίοι με τις γνώσεις που διαθέτουν θα καθορίσουν το φύλο ανατροφής καθώς και τη θεραπευτική πορεία που θα ακολουθήσει.

B. Ανιχνευτικά προγράμματα νεογνών

Η ΣΥΕ πληρεί τις προϋποθέσεις για να συμπεριληφθεί στα ανιχνευτικά προγράμματα νεογνών γιατί είναι σχετικά συχνή νόσος, απειλητική για τη ζωή, διαγιγνώσκεται εύκολα, είναι θεραπεύσιμη και η έγκαιρη ανίχνευση προλαμβάνει επιζήμιες επιπτώσεις. Η υποψία για ΣΥΕ τίθεται όταν η τιμή της 17 – ΟΗΠ στο διηθητικό χαρτί μετρημένη με Ραδιοανοσολογική μέθοδο (RIA) είναι υψηλή (84). Τα πρόωρα καθώς και τα βαρέως πάσχοντα νεογέννητα, λόγω στρες, έχουν υψηλότερες τιμές 17 – ΟΗΠ με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό στην πολιτεία του Wisconsin τα συνιστώμενα όρια είναι 165 ng/ml για νεογνά με βάρος μικρότερο των 1,300 g και 40 ng/ml για νεογνά με βάρος μεγαλύτερο των 2,200 g, κάτι όμως που δεν ακολουθείται ομοιόμορφα από άλλες πολιτείες ή χώρες (90).

Η υψηλότερη συχνότητα ΣΥΕ παρατηρείται σε κλειστούς γεωγραφικά πληθυσμούς όπως οι Εσκιμώοι Yupik στη Δυτική Αλάσκα (1:280) ενώ στους περισσότερους πληθυσμούς παρατηρείται σε συχνότητα από 1:10,000 μέχρι 1:18,000 (85). Η εφαρμογή των ανιχνευτικών προγραμμάτων έχει συμβάλει θετικά στην έγκαιρη διάγνωση των νεογνών, με αποτέλεσμα τη μείωση της νοσηρότητας/ θνητότητας στα νεογνά με απώλεια άλατος και τον έγκαιρο καθορισμό του φύλου ανατροφής (86, 87). Επιπλέον, τα πάσχοντα με την απλή αρρενοποιητική μορφή άρρενα θα τύχουν έγκαιρης θεραπείας έτσι ώστε να αποφευχθούν σημεία πρώιμης σεξουαλικής ωρίμανσης και επιτάχυνσης της σκελετικής ηλικίας. Σε μικρότερο ποσοστό μπορεί να εντοπισθούν και άτομα με

τη μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ, κυρίως αυτά που φέρουν σοβαρές μεταλλάξεις και έχουν και υψηλότερες τιμές 17 – ΟΗΠ (88).

Για να υπάρχει ικανοποιητική ευαισθησία στα ανιχνευτικά προγράμματα θα πρέπει τα όρια για την 17 – ΟΗΠ να είναι τόσο χαμηλά ώστε να παρατηρούνται θετικά αποτελέσματα μόνο σε ένα ποσοστό 0.3–0.5%, όπου όμως μειώνεται σημαντικά η ειδικότητα. Η συμπερίληψη της μοριακής ανάλυσης με DNA που να λαμβάνεται από το ίδιο διηθητικό χαρτί ως δεύτερο επίπεδο ανίχνευσης θα συμβάλει θετικά στην αποφυγή του μεγάλου αριθμού επανελέγχου σε μεγάλο αριθμό νεογνών επειδή 90–95% των μεταλλαγμένων αλληλίων έχουν συνήθως μία ή περισσότερες από τις γνωστές μεταλλάξεις (89).

Γ. Ορμονικός προσδιορισμός

Η διέγερση των επινεφριδίων με ACTH, που πρέπει να γίνεται μετά την 1^η μέρα ζωής, και μέτρηση της απάντησης της 17 – ΟΗΠ μερικές φορές καθίσταται απαραίτητη επειδή η 17 – ΟΗΠ μπορεί να είναι υψηλή και επί έλλειψης των ενζύμων 11β-υδροξυλάσης και 3β-υδροξυστεροειδικής δευδρογενάσης. Για την πλήρη εξακρίβωση της ενζυματικής διαταραχής πρέπει να γίνεται μέτρηση και των άλλων επινεφριδιακών στεροειδών όπως, Δεοξυκορτικοστερόνης, 11-δεοξυκορτιζόλης, 17-OH πρεγνενολόνης, DHEA, και Ανδροστενεδιόνης και στη συνέχεια, αξιολόγηση του λόγου πρόδρομος/παράγωγος ουσία. Επί αμφιβολίας, προέχει η έγκαιρη θεραπεία του παιδιού και επανέλεγχος σε μεταγενέστερο στάδιο (5).

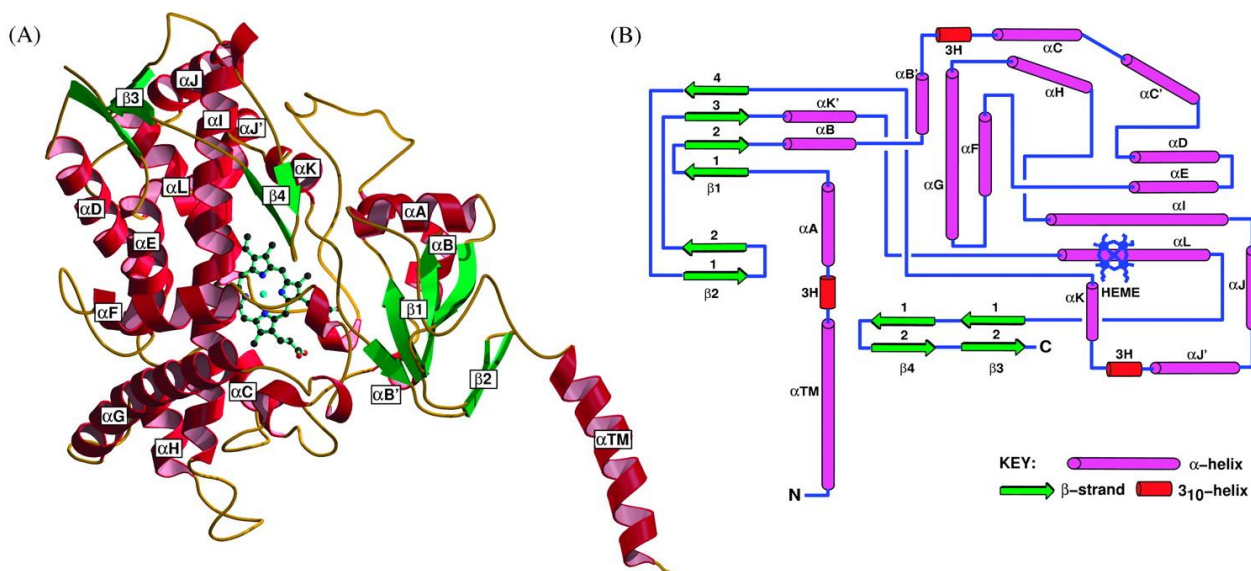
Αυξημένα επίπεδα Ρενίνης, δραστηριότητας ρενίνης πλάσματος (PRA) και ιδίως ο αυξημένος λόγος δραστηριότητας Ρενίνης πλάσματος προς Αλδοστερόνη ούρων 24ώρου συνηγορούν για έλλειψη της Αλδοστερόνης (90). Οι τιμές αυτές ωστόσο μπορεί να βρεθούν αυξημένες σε ασθενείς με φυσιολογική έκκριση Αλδοστερόνης που έχουν υψηλά επίπεδα κυκλοφορούντων ACTH, 17-ΟΗΠ, και Προγεστερόνης. Ως αποτέλεσμα είναι το βιοχημικό προφίλ των ασθενών με την απλή αρρενοποιητική μορφή που δεν ρυθμίζονται ικανοποιητικά να μοιάζει με αυτό των ασθενών με τη μορφή με απώλεια άλατος (97). Για τον ακριβή προσδιορισμό του φαινότυπου χρειάζεται ιδανικά να γίνει συσχέτιση των επιπέδων αλδοστερόνης πλάσματος και ούρων με τη δραστηριότητα ρενίνης πλάσματος και το ισοζύγιο νατρίου.

6. Γονίδιο CYP21A2

A. Δομή του γονιδίου CYP21A2

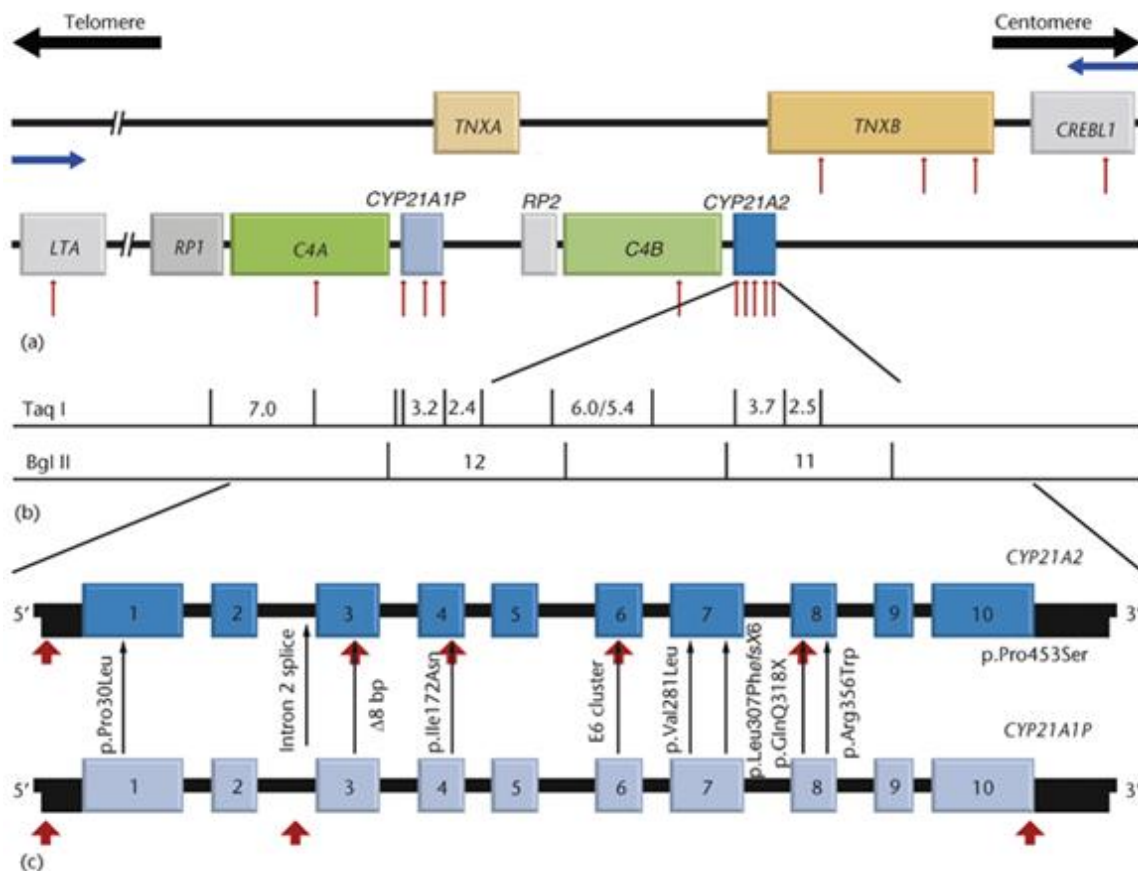
Η στεροειδική 21 – Υδροξυλάση (P450c21, CYP21) είναι ένα μικροσωμιακό ένζυμο του κυτοχρώματος P450, το οποίο καταλύει την μετατροπή 17-ΟΗΠ σε 11- δεοξυκορτιζόλη και της Προγεστερόνης σε Δεοξυκορτικοστερόνη (91-93). Όπως συμβαίνει και με τα άλλα μικροσωμιακά P450s ένζυμα, το ένζυμο δέχεται ηλεκτρόνια από την NADPH-εξαρτώμενη κυτοχρωμακή P450 αναγωγή (92) ανάγοντας το μοριακό οξυγόνο και υδροξυλιώνοντας το υπόστρωμα. Η P450 αναγωγή είναι απαραίτητη επειδή το NADPH δίνει ζεύγη ηλεκτρονίων, ενώ τα P450s ένζυμα δέχονται μόνο απλά ηλεκτρόνια (94). Το ένζυμο CYP21 όπως

φαίνεται στην εικόνα 9 στον άνθρωπο έχει φυσιολογικά 494 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα περίπου 52 kDa (95-97).



Εικόνα 9. (A) Μοντέλο της ανθρώπινης 21 – Υδροξυλάσης. Με κόκκινο οι Έλικες, σημαδεμένες από αΑ έως αL με τη διαμεμβρανική έλικα ως αTM, με πράσινο η βήτα πτυχωτή επιφάνεια (strands) με τα πτυχωτά φύλλα (sheets) β1 έως β4. Στην ομάδα της Αίμης το άτομο άνθρακα με μαύρο, το οξυγόνο με κόκκινο το άζωτο με σκούρο μπλε και ο σίδηρος με ανοικτό μπλε. (B) Σχηματική αναπαράσταση της δευτερογενούς δομής του μοντέλου της 21 – Υδροξυλάσης (HERA). Οι άλφα έλικες από αΑ έως αL, 3₁₀ έλικες επισημαίνονται 3H, βήτα πτυχωτά φύλλα β1 έως β4 και κάθε βήτα πτυχωτή επιφάνεια απαριθμείται με κάθε βήτα πτυχωτό φύλλο. Φαίνεται η θέση της ομάδας της αίμης , και τα N και C τελικά.

Το γονίδιο *CYP21A2*, και το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* εντοπίζονται στο μέσο του γενετικού τόπου του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας στον βραχύ βραχίονα του χρωμοσώματος 6 (6p21.3) μεταξύ των γονιδίων *HLA I* και *II*, και περίπου 30 kb μακριά από τα γονίδια *C4B* and *C4A* που κωδικοποιούν το 4ο μέρος του συμπληρώματος όπως απεικονίζεται στην εικόνα 10 (98-100) Επιπρόσθετα το γονίδιο *RP1* εδράζεται στη περιοχή 5' του γονιδίου *C4A* και κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη παρόμοια με την πρωτεΐνη DNA ελικάση. Επίσης ένα ελλιπές (truncated) αντίγραφο του γονιδίου *RP1* το *RP2*, βρίσκεται μεταξύ του ψευδογονιδίου *CYP21A1P* και του *C4B* (101, 102). Τα γονίδια *CYP21A2*, *C4*, και *RP* εκφράζονται στην ίδια κατεύθυνση.



Εικόνα 10. α. Το λειτουργικό γονίδιο *CYP21A2* και το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* διατάσσονται σε επαναλαμβανόμενη αλληλουχία με τα δύο γονίδια C4A και C4B, που κωδικοποιούν τον παράγοντα 4 του συμπληρώματος. Το λειτουργικό *TNXB* και το *TNXA* ψευδογονίδιο εδράζονται στο μέρος του συμπληρώματος. Τα κόκκινα βέλη δείχνουν τις κατά προσέγγιση θέσεις των ανιχνευτών MLPA
 β. Γενωμικό DNA που αρχικά διασπάστηκε από τα ένζυμα περιορισμού *TaqI* ή *BglII* και που στη συνέχεια υβριδοποιήθηκε με ραδιοσημασμένους κλώνους DNA των γονιδίων *CYP21* και *C4*.
 γ. Εννέα από τις 10 συνήθεις μεταλλάξεις μεταφέρονται με μικρο-μετατροπές από το γονίδιο *CYP21A1P* στο *CYP21A2*. Πέντε MPLA ανιχνευτές (κόκκινα βέλη) είναι ειδικά για το γονίδιο *CYP21A2* και τρεις ανιχνεύουν αλληλουχίες *CYP21A1P*.

Το γονίδιο *CYP21A2* αποτελείται από δέκα εξόνια και έχει μέγεθος μεγαλύτερο από 3.1 kb. Το μετάγραφο που προκύπτει μεγέθους 2.182 βάσεων κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο μήκους 494 ή 495 αμινοξέων. Ο πολυμορφισμός αυτός προκύπτει από τον πολυμορφισμό μεγέθους του γονιδίου στο εξόνιο 1, όπου η αλληλουχία (CTG) βρίσκεται 4 ή 5 φορές. Το γονίδιο είναι μέρος μιας περιοχής DNA, μεγέθους 30.000 ζευγών βάσεων, η οποία υπέστη διπλασιασμό κατά την εξέλιξη. Το γεγονός αυτό στηρίζεται από την ύπαρξη επαναλαμβανομένων αλληλουχιών C4A – *CYP21A1P* και C4B – *CYP21A2* με τα γονίδια να κωδικοποιούν για τον παράγοντα 4 του συμπληρώματος. Τα γονίδια *CYP21A2* και *CYP21A1P* εμφανίζουν 98% ομολογία στα εξόνια τους και 96% ομολογία στα ιντρόνιά τους. Ωστόσο το *CYP21A1P* περιέχει μια σειρά από βλαβερές μεταλλάξεις, που οδηγούν σε μία μη λειτουργική και πρόωρα τερματιζόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα (95, 96, 103). Το γονίδιο *CYP21A2* κωδικοποιεί μια πλήρως λειτουργική πρωτεΐνη, το ένζυμο 21- Υδροξυλάση. Έχει παρατηρηθεί ένας μεταβλητός αντιγράφων αριθμός RCCX (*C4-CYP21A2* και *C4-CYP21A1P*) ο οποίος στις πλείστες των περιπτώσεων αντιστοιχεί σε 69% των αλληλίων στην Καυκάσια φυλή (104).

B. Μεταγραφή

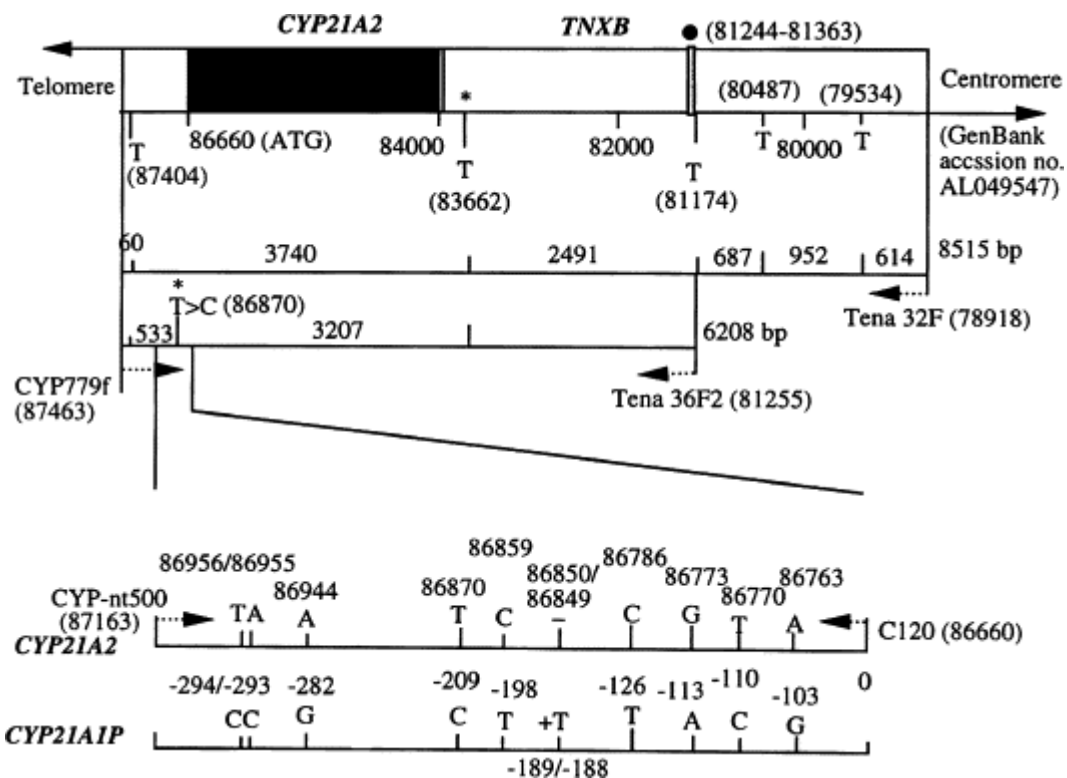
Το πιο σημαντικό γονίδιο για αντιγραφή στην περιοχή C4-*CYP21A2* είναι αυτό του γονιδίου *CYP21A2*, το οποίο ξεκινά 10–11 νουκλεοτιδικές βάσεις πριν από το αρχικό AUG κωδικόνιο εκκίνησης. Εκφράζεται εξ ολοκλήρου στα επινεφρίδια,

εν αντιθέσει με τα γονίδια *C4A*, *C4B*, και *TNXB* που κύρια εκφράζονται σε άλλους ιστούς (105).

Το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* εκφράζεται ειδικά στον ακέραιο επινεφριδιακό φλοιό σε ποσοστό 10–20% συγκριτικά με το *CYP21A2* (106). Όμως τα δυο πρώτα ιντρόνια του ψευδογονιδίου εξωθούνται ακανόνιστα (spliced out). Ταυτόχρονα ένα μη καθορισμένο ποσοστό μεταγραφικών παραγώγων περιλαμβάνουν επιπλέον εξόνια στη περιοχή ανάμεσα στο τέλος του *CYP21A1P* και της αρχικής περιοχής του *C4B*. Υπάρχουν μόνο 4 διαφορές στα πρώτα 176 νουκλεοτίδια μεταξύ των γονιδίων *CYP21A1P* και *CYP21A2* όπως φαίνεται στην εικόνα 11.

<http://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S1096719206001156-gr1.gif>

Φαίνεται ότι οι πιο σημαντικές διαφορές είναι στο νουκλεοτίδιο –113, που είναι μια Γουανίνη στο *CYP21A2* και μια Αδενίνη στο *CYP21A1P*, καθώς και στο νουκλεοτίδιο – 126, που είναι μια Κυτοσίνη στο *CYP21A2* και Θυμίνη στο *CYP21A1P* (107). Το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* δημιουργεί μεταγραφικά παράγωγα, τα οποία είναι αβέβαιης λειτουργικής σημασίας (108).



Εικόνα 11. Συγκριτικές διαφορές του γονιδίου *CYP21A2* και του ψευδογονιδίου *CYP21A1P*. Στο κάτω μέρος απεικονίζονται οι πολυμορφισμοί του ενεργού γονιδίου *CYP21A2* και του ψευδογονιδίου *CYP21A1P*.

Η ACTH αποτελεί τον κύριο παράγοντα που ρυθμίζει την έκφραση του *CYP21A2* στη στηλιδωτή ζώνη του επινεφριδιακού φλοιού (14). Η επαγωγική δράση της ACTH προάγεται κυρίως μέσω αυξημένης μεταγραφής, διπλασιάζεται με το cAMP και απαιτεί την παρουσία της πρωτεϊνικής κινάσης A (109-111).

Γ. Σύνδεση με HLA

Η ΣΥΕ οφειλόμενη στην έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης έχει συνδεθεί με τους πολυμορφισμούς του *HLA*, λόγω γεινίασης του γονιδίου *CYP21A2* με την περιοχή του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας στο χρωμόσωμα 6 (112,

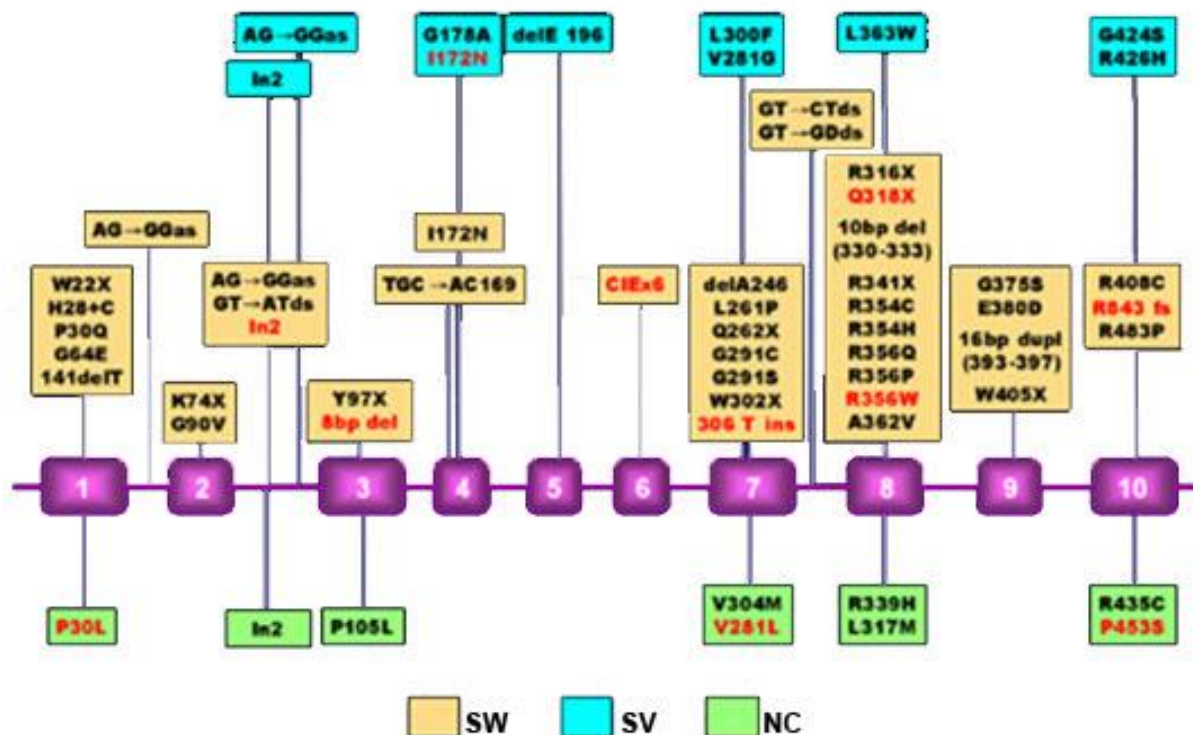
113). Πριν από την κλωνοποίηση του γονιδίου *CYP21A2*, η γενετική αποτύπωση του *HLA* αποτελούσε την κύρια μέθοδο για προγεννητική διάγνωση (114). Συγκεκριμένες μορφές έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης συνδέονται με συγκεκριμένους συνδυασμούς (απλότυπους) των *HLA* αντιγόνων προφανώς με το φαινόμενο της συνδετικής ανισοζυγίας (linkage disequilibrium). Στους Βορειοευρωπαϊκούς πληθυσμούς η πιο ενδιαφέρουσα παρατήρηση αφορά την σύνδεση της μορφής με απώλεια άλατος με τον απλότυπο *HLA-A3; BW47; DR7*. Η μη κλασσική μορφή συχνά συνδέεται με τον απλότυπο *HLA-B14;DR1*, ιδίως στους Ανατολικοευρωπαϊκούς πληθυσμούς Εβραϊκής προέλευσης (115, 116). Ο συγκεκριμένος απλότυπος συνδέεται με την μετάλλαξη p.Val281Leu του γονιδίου *CYP21A2* και με ένα διπλασιασμό του συμπληρώματος *C4A* και του ψευδογονιδίου *CYP21A1P* (117).

Δ. Μεταλλάξεις που προκαλούν έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης

<http://www.cypalleles.ki.se/cyp21.htm>

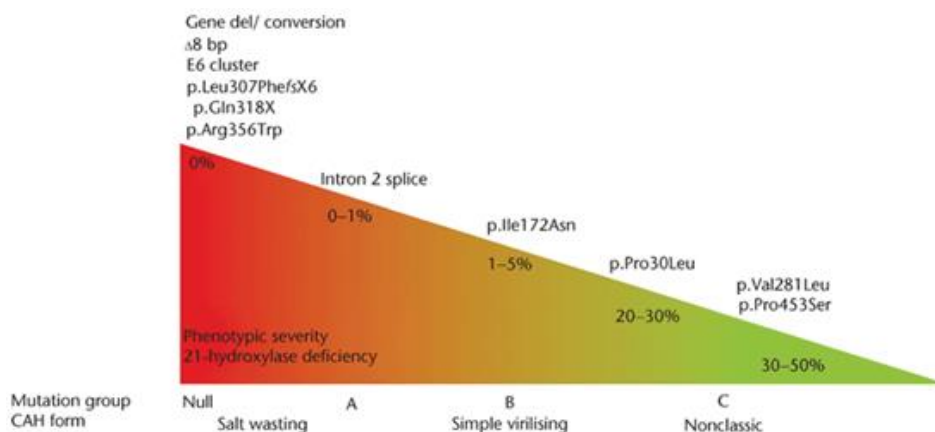
Οι περισσότερες περιγραφείσες μεταλλάξεις οι οποίες προκαλούν έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης είναι το αποτέλεσμα ανασυνδυασμών μεταξύ του φυσιολογικά ενεργού γονιδίου *CYP21A2* και του ψευδογονιδίου *CYP21A1P*. Οι μηχανισμοί αυτοί αφορούν άνισους επιχιασμούς (crossing over) κατά τη διάρκεια της μείωσης με αποτέλεσμα την συνολική απάλειψη του *C4B* και μέρους του ενεργού γονιδίου *CYP21A2* ή εμφανείς μετατροπές (conversions), οι οποίες οδηγούν σε παθολόγες μεταλλάξεις στο ενεργό γονίδιο *CYP21A2* μεταφερόμενες από το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* (118-123).

Οι βλαβερές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A1P* περιλαμβάνουν: μια αντικατάσταση A→G 13 νουκλεοτίδια (nt) πριν από το τέλος του ιντρονίου 2 που οδηγεί σε ανώμαλο μάτισμα του pre-mRNA, μία απάλειψη 8-nt στο εξόνιο 3 και μία 1-nt εισχώρηση στο εξόνιο 7, κάθε μία από τις οποίες αλλάζει το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame) της μετάφρασης και μία μη νοηματική (nonsense) μετάλλαξη στο κωδικόνιο 318 στο εξόνιο 8 (123). Υπάρχουν επίσης οκτώ παρανοηματικές (missense) μεταλλάξεις στο *CYP21A1P*, επτά από τις οποίες έχουν βρεθεί σε ασθενείς με έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης. Στην εικόνα 12 απεικονίζονται οι ανευρεθείσες μεταλλάξεις και οι θέσεις στις οποίες βρίσκονται (http://www.endopedonline.com.ar/nuevo_sitio/revision-de-temas-nuevas-pautas-para-el-diagnostico-y-tratamiento-de-la-hiperplasia-suprarrenal-congenita-ed-7).



Εικόνα 12 . Μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A2*

Η ποικιλία στην κλινική έκφραση της νόσου, εμφανής με τις διάφορες μορφές που παρουσιάζεται είναι το αποτέλεσμα του βαθμού της εναπομείνουσας δραστηριότητας της 21 – Υδροξυλάσης που προκύπτει από την υποκείμενη γενετική βλάβη (124-138) και απεικονίζεται στην εικόνα 13 (100).

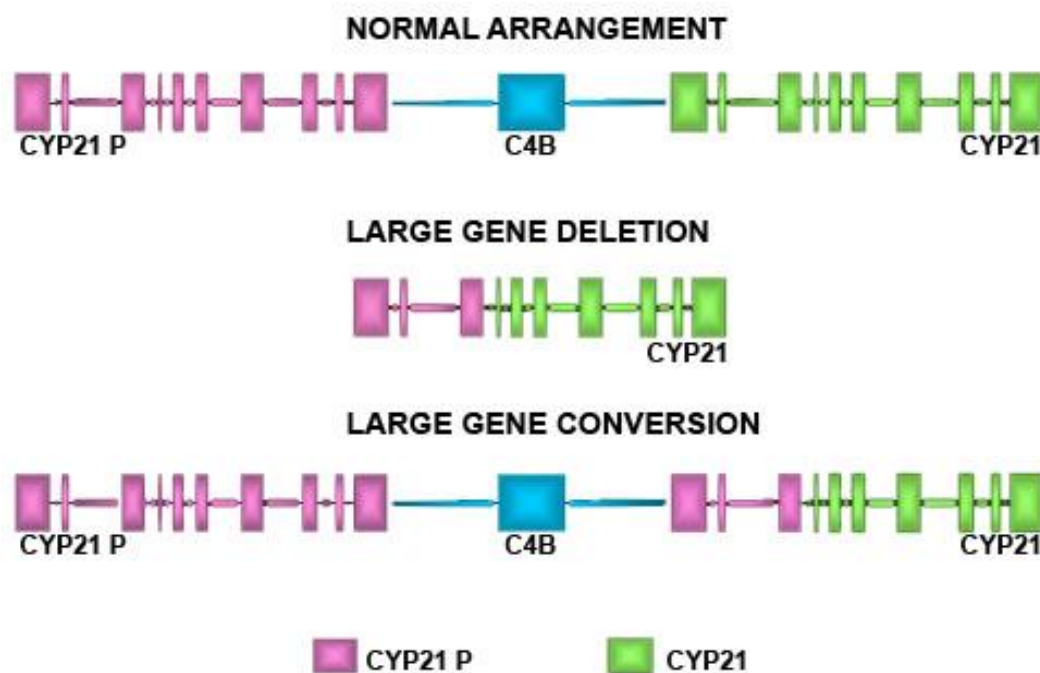


Εικόνα 13. Κλινικός φαινότυπος ΣΥΕ και υποκείμενη γενετική βλάβη στη ΣΥΕ λόγω έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης (21OHD) με βάση τη δραστηριότητα *in vitro* του *CYP21A2*. Οι ομάδες null και A συνδέονται με την μορφή με απώλεια άλατος της 21OHD, η ομάδα B με την απλή αρρενοποιητική μορφή και η ομάδα C με τη μη κλασσική μορφή.

Δ1.Απαλείψεις και μεγάλες μετατροπές

Οι μεγάλες απαλείψεις στα γονίδια *C4B* και *CYP21A2* αποτελούν περίπου το 20% των αλληλίων στους ασθενείς με την κλασσική έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης στους πλείστους πληθυσμούς, αλλά σπανιότερα σε μερικές χώρες της Λατινικής Αμερικής (139, 140), όπως παραστατικά φαίνονται στην εικόνα 14

(http://www.endopedonline.com.ar/nuevo_sitio/revision-de-temas-nuevas-pautas-para-el-diagnostico-y-tratamiento-de-la-hiperplasia-suprarrenal-congenita-ed-7).



Εικόνα 14. Μεγάλες απαλείψεις και μετατροπές του γονιδίου *CYP21A2*.

Αρκετά από τα απαλειφθέντα αλληλία συνδέονται με τον *HLA* απλότυπο *A3;BW47;DR7*.(141) Οι απαλείψεις συνήθως εκτείνονται σε απόσταση 30 kb κάπου ανάμεσα στα εξόνια 3 και 8 του γονιδίου *CYP21A1P* οδηγώντας σε ένα μόνο γονίδιο *CYP21A2*, του οποίου το 5'-άκρο αντιστοιχεί στο *CYP21A1P* και το 3'-άκρο αντιστοιχεί στο *CYP21A2* (142). Όλοι οι ασθενείς που φέρουν απαλείψεις σε ομοζυγωτία υποφέρουν από την κλασσική μορφή της ΣΥΕ με απώλεια άλατος.

Οι μεγάλες γονιδιακές μετατροπές που αποτελούν το 10% των μεταλλάξεων στην κλασική ΣΥΕ κατά τις οποίες πολλαπλές μεταλλάξεις μεταφέρονται από το ψευδογονίδιο *CYP21A1P* στο *CYP21A2*, αναγνωρίζονται με την μέθοδο γενωμικού υβριδισμού (genomic blot hybridization), όταν επηρεάζονται συγκεκριμένα σημεία στο γονίδιο για τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Δ2. Μη Νοηματικές (Nonsense) και αλλαγής πλαισίου (frameshift) μεταλλάξεις.

Δύο άλλες μεταλλάξεις που φυσιολογικά βρίσκονται στο ψευδογονίδιο *CYP21A1P* καταργούν εντελώς την σύνθεση μιας ακέραιης 21 – Υδροξυλάσης και προκαλούν τη μορφή με απώλεια άλατος αν παρατηρηθούν στο αληθινό γονίδιο *CYP21A2*: η μη νοηματική μετάλλαξη στο κωδικόνιο 318 : p.Qln318stop (143) και η απάλειψη 8-nt στο εξόνιο 3 : c.707_714delGAGACTAC - 8bpdelE3 (144).

Δ3. Α ή C → G μετάλλαξη στο ιντρόνιο 2 - (c.656A/C>G) ή IVS2-13A/C>G

Το νουκλεοτίδιο 13 bp πριν από το τέλος του ιντρονίου 2 (nt 656) φυσιολογικά είναι Α ή C. Μετάλλαξη σε G αποτελεί το πιο σύνηθες αλληλίο που προκαλεί έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης. Αυτή η μετάλλαξη προκαλεί ανώμαλο μάτισμα στο ιντρόνιο 2 με διατήρηση 19 νουκλεοτιδίων που φυσιολογικά συμμετέχουν στο μάτισμα, οδηγώντας σε αλλαγή στο μεταφρασμένο πλαίσιο ανάγνωσης (translational reading frame) (124, 144). Σχεδόν όλο το mRNA ματίζεται ανώμαλα, αλλά σε κυτταροκαλιέργειες αναγνωρίζεται ένα μικρό μέρος του φυσιολογικού mRNA. Αν δεν υπάρχουν άλλες μεταλλάξεις, συντίθεται μικρή ποσότητα του ενζύμου. Αν και δεν είναι γνωστό ποιά είναι η αναλογία του

φυσιολογικού mRNA σε σχέση με το παθολογικό στο επινεφρίδιο, οι ομοζυγώτες ή ημιζυγώτες ασθενείς για τη συγκεκριμένη μετάλλαξη συνήθως έχουν τη μορφή με απώλεια άλατος, έτσι που να συμπεραίνεται ότι έχουν ανεπαρκή ενζυματική δραστηριότητα η οποία δεν επιτρέπει την σύνθεση της αλδοστερόνης.

Δ4. p.Pro-30→Leu (p.Pro30Leu)

Η μετάλλαξη αυτή, η οποία βρίσκεται περίπου στο 1/6 των αλληλίων σε ασθενείς με τη μη κλασσική μορφή, οδηγεί σε ενζυματική δραστηριότητα 30–60% της φυσιολογικής δράστικότητας όταν εκφράζεται σε καλλιέργεια κυττάρων.(145) Όμως η δραστηριότητα χάνεται όταν τα κύτταρα λύνονται λόγω αστάθειας του ενζύμου. Οι ασθενείς με τη μη κλασσική μορφή ΣΥΕ που έχουν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη έχουν τη τάση να παρουσιάζουν εντονότερα σημεία υπερανδρογοναιμίας συγκριτικά με αυτούς που φέρουν τη συχνότερη μετάλλαξη p.Val281Leu (126, 145).

Όπως και σε άλλα P450 μικροσωμιακά ένζυμα, η 21 – Υδροξυλάση κατευθύνεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου κυρίως με την υδροφοβική “ουρά” στο αμινοτελικό άκρο. Αυτή η ουρά είναι αναγκαία για την ενζυματική δραστηριότητα και σταθερότητα (146, 147). Τα περισσότερα P450 ένζυμα έχουν ένα ή περισσότερα κατάλοιπα προλίνης που ξεχωρίζουν αυτή την ουρά από το υπόλοιπο πολυπεπτίδιο. Αυτά τα κατάλοιπα προσβλέπουν στη δημιουργία καμπής στην πολυπεπτιδική αλυσίδα, την οποία καταργεί η μετάλλαξη p.Pro30Leu και οδηγεί σε ανάρμοστη δίπλωση (improper folding) του πολυπεπτιδίου. Το γεγονός αυτό μπορεί να παρεμβαίνει στη χωροθέτηση του

ενζύμου στο ενδοπλασματικό δίκτυο (148). Η p.Pro30Leu μεταλλαγμένη CYP21 δεν αναγνωρίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο σε μερικές αλλά όχι σε άλλες μελέτες (149).

Δ5. p.Ile-172→Asn (pIle172Asn)

Η μετάλλαξη αυτή, η μοναδική που σχετίζεται ειδικά με την απλή αρρενοποιητική μορφή της ΣΥΕ, οδηγεί σε σύνθεση ενζύμου με δραστηριότητα περίπου 1% του φυσιολογικού με φυσιολογική συγγένεια με το υπόστρωμα (K_m) αλλά μειωμένη δραστικότητα (V_{max}) (150, 151). Το κατάλοιπο της ισολευκίνης φυσιολογικά σε αυτή τη θέση στην έλικα E είναι ισχυρά διατηρημένο σε διάφορα P450 ένζυμα, και αυτή η περιοχή της πρωτεΐνης σε άλλα P450s αλληλεπιδρά με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου (152). Μετάλλαξη σε αυτό το υδροφοβικό κατάλοιπο εμποδίζει αυτή τη διαδραστικότητα, εξασθενώντας τη σχέση του ενζύμου με το ενδοπλασματικό δίκτυο (104). Επιπλέον, αυτή η μετάλλαξη μπορεί να εμποδίζει μια ενδομοριακή υδροφοβική αλληλεπίδραση που σταθεροποιεί τη δευτερογενή δομή του ενζύμου. Το μεταλλαγμένο ένζυμο είναι παθολογικά ευαίσθητο στη πέψη με πρωτεάσες και δεν ενσωματώνει ικανοποιητικά την αίμη με αποτέλεσμα να είναι μη δραστικό (153).

Η αλδοστερόνη φυσιολογικά παράγεται κατά 100-1000 φορές λιγότερο της κορτιζόλης. Γι' αυτό, η δραστικότητα της 21 – Υδροξυλάσης πρέπει να μειωθεί σε υπερβολικά χαμηλά επίπεδα για να επηρεάσει την σύνθεση της αλδοστερόνης. Η ύπαρξη έστω και 1% της φυσιολογικής δραστικότητας επιτρέπει την επαρκή βιοσύνθεση αλδοστερόνης που εμποδίζει την σημαντική απώλεια άλατος, έτσι

που να δικαιολογείται η κλινική έκφραση της απλής και όχι της με απώλεια άλατος μορφής της ΣΥΕ.

Δ6. p.Val-281→Leu (p.Val281Leu)

Η μετάλλαξη p.Val281Leu παρατηρείται στην πλειονότητα των ασθενών που έχουν τη μη κλασσική μορφή ΣΥΕ και φέρουν τον *HLA* απλότυπο *B14;DR1*, μια σύνδεση που πιθανόν να εξηγείται με το γενετικό φαινόμενο του ιδρυτή (118). Σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, όπως για παράδειγμα στους Εβραϊκής καταγωγής Ανατολικοευρωπαίους, αυτό αποτελεί συνήθη πολυμορφισμό με υπολογιζόμενη συχνότητα πέραν του 1%, ενώ σε ανιχνευτικό μοριακό έλεγχο νεογνών στη Νέα Ζηλανδία η υπολογιζόμενη συχνότητα φορέων είναι 2% (76). Γενικώς, περίπου 70% των μη κλασσικών αλληλίων φέρουν τη μετάλλαξη p.Val281Leu (79, 154). Ωστόσο, σε διάφορες εθνικές ομάδες όπως στους Γιουγκοσλάβους και στους Ιάπωνες, η παρουσία του απλότυπου *HLA-B14, DR1* (και/ή p.Val281Leu) είναι λιγότερο συχνή σε ασθενείς με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ. Η μετάλλαξη p.Val281Leu οδηγεί σε ενζυματική δραστηριότητα 50% της φυσιολογικής όταν το υπόστρωμα είναι η 17-ΟΗΠ και μόνο σε 20% της φυσιολογικής δράσης όταν το υπόστρωμα είναι η Προγεστερόνη (150, 155). Το μεταλλαγμένο ένζυμο πιθανόν να μην εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ή να μην μπορεί να συνδεθεί με την αίμη ή ακόμα να επηρεάζει και τη μεταφορά πρωτονίων (5).

Δ7. Άλλες μεταλλάξεις και πολυμορφισμοί

Οι μεταλλάξεις που δεν είναι μετατροπές γονιδίων, δηλαδή δεν βρίσκονται συνήθως στο ψευδογονίδιο *CYP21A1P*, αποτελούν το 5–10% των αλληλίων της

έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης στους πλείστους πληθυσμούς. Οι πιο συχνή από αυτές είναι η p.Pro453Ser. Η μετάλλαξη αυτή αναγνωρίζεται σε διάφορους πληθυσμούς, γεγονός που συνηγορεί ότι το *CYP21A1P* πιθανόν να φέρει την p.Pro453Ser ως τυχαίο πολυμορφισμό και ότι αυτή η μετάλλαξη μεταφέρεται στο *CYP21A2* με πανομοιότυπο τρόπο όπως και οι υπόλοιπες μεταλλάξεις που προκαλούν έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης (156, 157).

7. Θεραπεία

A. Αναπλήρωση γλυκοκορτικοειδών

Η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών καταστέλλει την υπερπαραγωγή CRH και ACTH από τον υποθάλαμο και υπόφυση αντίστοιχα και μειώνει τα παθολογικά επίπεδα των επινεφριδιακών ανδρογόνων. Η προτιμητέα μορφή κορτικοειδών στα παιδιά είναι η Υδροκορτιζόνη σε δοσολογία 10 με 20 mg/m²/ημέρα διαιρουμένη σε δύο ή τρεις δόσεις. Η δόση αυτή είναι μεγαλύτερη από την φυσιολογική παραγωγή κορτιζόλης που είναι 6–7 mg/m²/ημέρα στα παιδιά και εφήβους (158). Η ελάχιστη δοσολογία στα νεογνά είναι 6mg/ημέρα διαιρούμενη σε τρεις δόσεις. Η χορήγηση υδροκορτιζόνης σε δόσεις μεγαλύτερες από τη φυσιολογική έκκριση είναι απαραίτητη για την επαρκή καταστολή των επινεφριδιακών ανδρογόνων και την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας εκδήλωσης επινεφριδιακής κρίσης (159).

Ο βραχύς χρόνος ημίσειας ζωής της υδροκορτιζόνης ελαχιστοποιεί την καταστολή της αύξησης και την εμφάνιση άλλων ανεπιθύμητων παρενεργειών που παρατηρούνται με τη χρήση πρεδνιζόνης ή δεξαμεθαζόνης. Από την άλλη,

η χορήγηση ενός βραχείας δράσης γλυκοκορτικοειδούς σε μία και μόνο δόση ημερησίως είναι ανεπαρκής για να καταστείλει την υπερπαραγωγή της ACTH (160). Στους έφηβους και στους ενήλικες μπορούν να χορηγηθούν μικρές δόσεις πρεδνιζόνης (5–7.5 mg ημερησίως σε δύο δόσεις) ή δεξαμεθαζόνης (0.25–0.5 mg ημερησίως σε μία ή δύο δόσεις). Οι ασθενείς πρέπει να παρακολουθούνται σχολαστικά για τυχόν εμφάνιση σημείων ιατρογενούς συνδρόμου Cushing, όπως η ταχεία πρόσληψη βάρους, η υπέρταση, οι ραβδώσεις στον κορμό και η οστεοπενία, που θα έχουν αρνητική επίδραση στο τελικό ανάστημα και στην απόκτηση ιδανικής οστικής μάζας.

Η αποτελεσματικότητα της θεραπείας εκτιμάται με κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα. Η φυσιολογική αύξηση, η συμβατή για την χρονολογική ηλικία οστική ωρίμανση καθώς και η απουσία σημείων πρώιμης σεξουαλικής ωρίμανσης είναι δείκτες επαρκούς θεραπείας. Η εργαστηριακή παρακολούθηση περιλαμβάνει τον πρωινό προσδιορισμό των 17-OHΠ, Ανδροστενεδιόνης, Τεστοστερόνης (σε κορίτσια και προεφηβικά αγόρια) καθώς και της ACTH και Ηλεκτρολυτών / Ρενίνης στη μορφή ΣΥΕ με απώλεια άλατος. Για αποφυγή υπερθεραπείας τα επίπεδα της 17 – OHΠ πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 100-1000 ng/dL ή 3-30 nmol/l προσαρμοσμένα ανάλογα με την ηλικία και το φύλο (160). Παρά τη σχολαστική παρακολούθηση και την ικανοποιητική συμμόρφωση των ασθενών στην αγωγή, οι περισσότερες αναδρομικές μελέτες δείχνουν ότι το τελικό ανάστημα υπολείπεται κατά 1-2 σταθερές αποκλίσεις από το ανάστημα-στόχος ή από αυτό του γενικού πληθυσμού (50).

Αν ο έλεγχος δεν μπορεί να επιτευχθεί με την υδροκορτιζόνη, τότε είναι λογική η περιοδική χρήση πρεδνιζόνης ή δεξαμεθαζόνης με προσοχή. Μετά την σύγκλιση των επιφύσεων μπορεί να χρησιμοποιηθούν η πρεδνιζόνη και δεξαμεθαζόνη ως δόση συντήρησης, σε δοσολογία που να μην ξεπερνά αυτή που αντιστοιχεί σε υδροκορτιζόνη 20 mg/m²/ημέρα, με προσεκτική παρακολούθηση για εμφάνιση ιατρογενούς συνδρόμου Cushing.

Σε στρεσογόνες καταστάσεις όπως εμπύρετα νοσήματα και χειρουργικές επεμβάσεις απαιτείται τριπλασιασμός της ημερήσιας δόσης λόγω ανικανότητας των πασχόντων ασθενών να ανταποκριθούν με αύξηση της ενδογενούς παραγωγής κορτιζόλης. Σε μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις ενδείκνυται η παρεντερική χορήγηση υδροκορτιζόνης (100 mg/m²/ημέρα) σε τέσσερις δόσεις για τουλάχιστον 24 ώρες προεγχειρητικά και 24 ώρες μετεγχειρητικά. Οι ασθενείς με την μη κλασσική μορφή κατά κανόνα δεν χρειάζονται αύξηση της δοσολογίας σε ήπιο στρες, όμως είναι λογική η αύξηση της δοσολογίας σε έντονα στρεσογόνες καταστάσεις.

Οι ασθενείς με την μη κλασσική μορφή ΣΥΕ χρήζουν θεραπείας όταν εμφανίζουν σημεία υπερανδρογοναιμίας. Συνήθως απαιτείται χαμηλή δόση υδροκορτιζόνης σε παιδιά με πρώιμη αδρεναρχή και με επιτάχυνση της οστικής ωρίμανσης. Οι έφηβες που παρουσιάζουν δασυτρυχισμό, ολιγομηνόρροια και ακμή καθώς και οι γυναίκες με υπογονιμότητα χρήζουν επίσης θεραπείας με πρεδνιζόνη ή δεξαμεθαζόνη. Οι άνδρες με μη κλασσική ΣΥΕ βελτιώνουν τις σπερματικές παραμέτρους με τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών (161).

B. Αντικατάσταση με αλατοκορτικοειδή

Τα βρέφη με έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης που πάσχουν από τη μορφή με απώλεια άλατος έχουν ανάγκη αλατοκορτικοειδών (φθοριουδροκορτιζόνη, συνήθως 0.1–0.2 mg και σπάνια μέχρι 0.4 mg ημερησίως) και συνήθως σκευάσματα χλωριούχου νατρίου (1 to 2g ημερησίως) μαζί με τη θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή. Η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος ή του τροποποιημένου γάλακτος αγελάδος σε νάτριο είναι περίπου 8 mEq/L, το οποίο είναι ικανοποιητικό για διατήρηση του ισοζυγίου του νατρίου στα υγιή βρέφη. Τα πάσχοντα βρέφη, επί απουσίας της Αλδοστερόνης, έχουν αυξημένη απώλεια νατρίου με αποτέλεσμα να χρειάζονται επιπρόσθετο νάτριο, ενώ τα μεγαλύτερα παιδιά αναπτύσσουν αντισταθμιστικά προτίμηση στα αλμυρά φαγητά.

Μερικές φορές η χορήγηση αλατοκορτικοειδών ενδείκνυται και σε παιδιά με την απλή αρρενοποιητική μορφή για επίτευξη μεγαλύτερης καταστολής των επινεφριδιακών ανδρογόνων και διατήρησης της 17 – ΟΗΠ σε ικανοποιητικά επίπεδα με μικρότερη δοσολογία γλυκοκορτικοειδών (90). Τα αυξημένα επίπεδα του νατρίου και τα χαμηλά επίπεδα Ρενίνης του πλάσματος καθώς και κλινικά σημεία όπως υπέρταση και ταχυκαρδία είναι σημεία υπέρβασης της δοσολογίας των αλατοκορτικοειδών (162).

Γ. Επινεφριδιεκτομή

Οι βλαπτικές συνέπειες από την ανεπαρκή θεραπεία, κυρίως στα θήλεα πάσχοντα παιδιά, και η μη ικανοποιητική καταστολή των ανδρογόνων έχει οδηγήσει στην υιοθέτηση της λαπαροσκοπικής αφαίρεσης των επινεφριδίων ως

εναλλακτικής λύσης (163). Τα σοβαρά πάσχοντα παιδιά με τον τρόπο αυτό αντιμετωπίζονται πιο εύκολα θεραπευτικά με τη χορήγηση γλυκοκορτικοειδών και αλατοκορτικοειδών ως επί νόσου Addison και αποφεύγεται η υπερπαραγωγή των ανδρογόνων. Η άποψη αυτή δεν έχει γίνει πλήρως αποδεκτή επειδή η επινεφριδικτομή είναι ριζική επέμβαση, θέτει το παιδί στον κίνδυνο της χειρουργικής επέμβασης και δημιουργεί τον κίνδυνο για ιατρογενή επινεφριδική κρίση. Επιπλέον, καταργείται πλήρως η παραγωγή DHEA, ορμόνη απαραίτητη για το μεταβολισμό των λιπιδίων, τη λίμπιντο και για την εν γένει ποιότητα της ζωής (164, 165). Παρόλο ότι υπάρχουν παιδιά που έχουν αντιμετωπιστεί με αυτό το χειρισμό, χρειάζονται επιπρόσθετα δεδομένα για την ευρεία εφαρμογή της σε περιπτώσεις ανθεκτικές στη θεραπεία.

Δ. Χειρουργική διόρθωση

Το φύλο ανατροφής στα πάσχοντα θήλεα νεογνά είναι αναμφίβολα το θήλυ φύλο, συμβατό με την χρωμοσωμιακή κατασκευή 46,XX και την φύση των έσω γεννητικών οργάνων, με απώτερο στόχο την εξασφάλιση της αναπαραγωγικής ικανότητας. Η παρουσία όμως των αμφίβολων γεννητικών οργάνων απαιτεί ορθολογιστική αντιμετώπιση, ψυχολογική στήριξη και χειρουργική διόρθωση. Η άποψη της χειρουργικής αποκατάστασης σε μεταγενέστερο στάδιο όταν το πάσχον άτομο θα μπορεί να επιλέξει μόνο του το φύλο ανατροφής δεν έχει γίνει καθολικά αποδεκτή (166). Η ανατροφή ενός παιδιού χωρίς φύλο είναι ψυχολογικά τραυματική για όλη την οικογένεια και εμπεριέχει κινδύνους κοινωνικής αποδοχής και διαταραχής της ταυτότητας του φύλου. Σε κοινωνίες

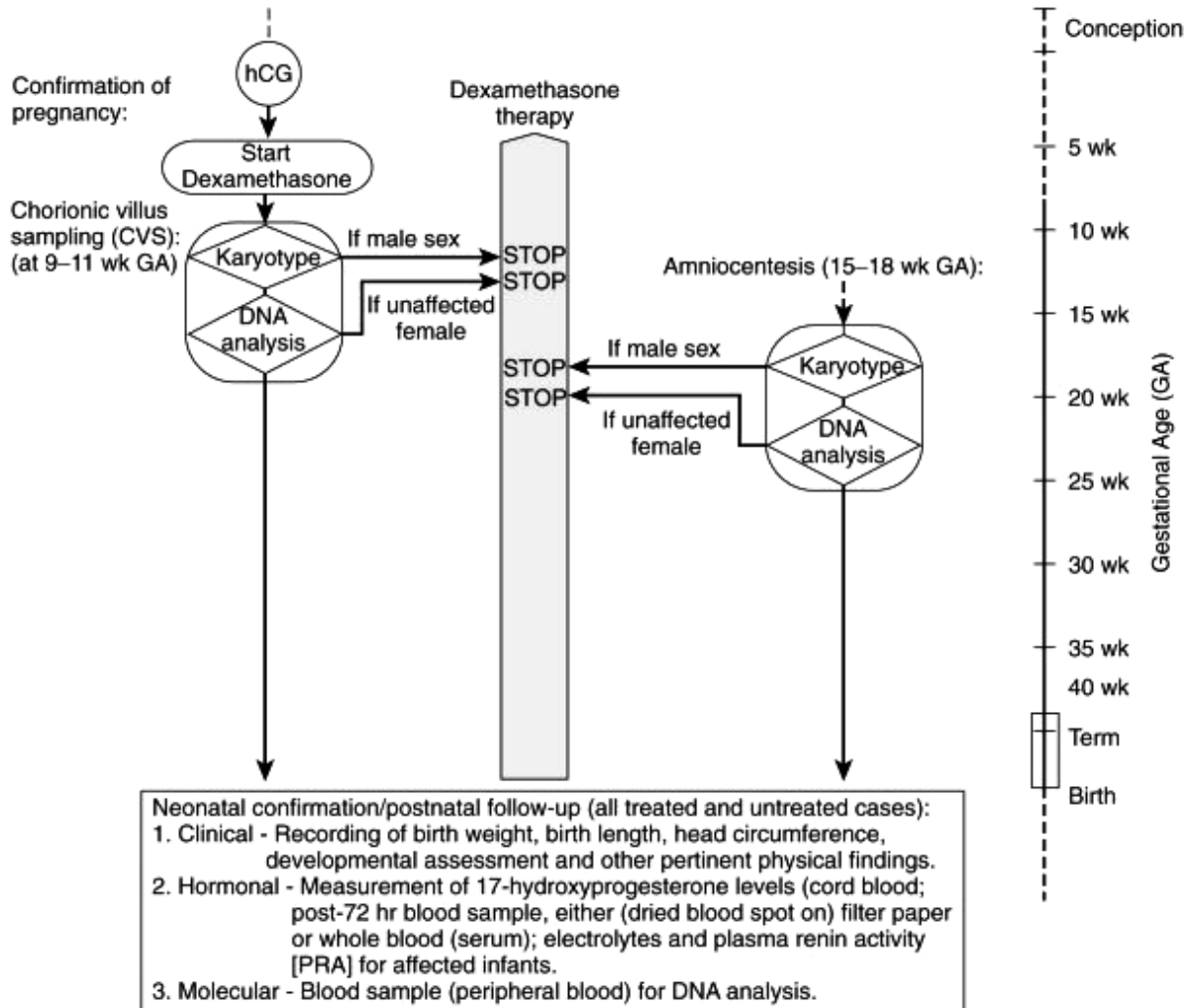
όπου υπερέχει η αξία του άρρενος φύλου ενδέχεται να υπάρξει προτίμηση ανατροφής του παιδιού σε άρρενα (66).

Η πλέον συνήθης προσέγγιση είναι η πλαστική αποκατάσταση και όχι η αφαίρεση της κλειτορίδας, η οποία διενεργείται κατά την βρεφική ηλικία και η διορθωτική χειρουργική αποκατάσταση σε μεταγενέστερο στάδιο (167). Η ανακατασκευή του κόλπου συνήθως διενεργείται στην εφηβεία, σε ηλικία όπου αναμένεται το άτομο να γίνει σεξουαλικά ενεργό (168). Η χειρουργική διόρθωση είναι πιο επιτυχής στα νεογνά με την απλή συγκλειση των χειλέων παρά σε αυτά όπου απαιτείται πλήρης ανακατασκευή του τελικού κόλπου λόγω κοινής εκβολής με την ουρήθρα (169). Με τη βελτίωση των χειρουργικών επεμβάσεων οι γυναίκες με ΣΥΕ δεν παρουσιάζουν προβλήματα γονιμότητας (170). Η στοχευμένη μείωση του βαθμού αρρενοποίησης έχει οδηγήσει στην προγεννητική θεραπεία των πασχόντων θηλέων.

E. Προγεννητική θεραπεία

Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης στην εγκυμονούσα μητέρα με σκοπό την καταστολή των εμβρυικών επινεφριδιακών ανδρογόνων έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον βαθμό αρρενοποίησης του θήλεος νεογνού που πάσχει από ΣΥΕ (171-175). Η δεξαμεθαζόνη δεν έχει αλατοκορτικοειδική δράση και διέρχεται από τον πλακούντα επειδή δεν μεταβολίζεται σημαντικά από την πλακουντιακή 11β-υδροξυστεροειδική δευδρογενάση (176). Η απαιτούμενη δόση είναι 20 μg/kg/ημέρα, βασισμένη στο προ της κύησης σωματικό βάρος (με μέγιστη ημερήσια δόση 1.5 mg σε τρεις διαιρεμένες δόσεις). Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης

ιδανικά πρέπει να ξεκινήσει πριν από την 7^η με 8^η εβδομάδα κύησης (174). Περίπου 70% των θηλέων πασχόντων που θεραπεύονται προγεννητικά γεννιούνται με φυσιολογικά ή ελαφρώς αρρενοποιημένα γεννητικά όργανα, ίσως λόγω της μη πλήρους καταστολής των επινεφριδιακών ανδρογόνων (177). Η πιθανότητα σοβαρής αρρενοποίησης των θεραπευθέντων παιδιών είναι μειωμένη συγκριτικά με τις πάσχουσες αδελφές τους και με άλλα πάσχοντα παιδιά που φέρουν τον ίδιο γονότυπο (173, 178). Ο σχεδιασμός της προγεννητικής θεραπείας βασίζεται στο φύλο του εμβρύου και την μοριακή ανάλυση από δείγμα χοριονικών λαχνών κατά τη 10^η-12^η εβδομάδα της κύησης. Αν το έμβρυο είναι άρρεν ή αν δεν πάσχει η θεραπεία με δεξαμεθαζόνη πρέπει να διακόπτεται για αποφυγή τοξικότητας με γλυκοκορτικοειδή, όπως φαίνεται και στην εικόνα 15 (<http://www.endotext.org/pediatrics/pediatrics8/pediatrics8.htm>).



Εικόνα 15. Σχεδιασμός προγεννητικής θεραπείας με δεξαμεθαζόνη με στόχο την αποφυγή αρρενοποίησης πάσχοντος θήλεος εμβρύου

Η χορήγηση δεξαμεθαζόνης στα πρώτα στάδια της κύησης, ιδίως με πιθανότητα μόνο 1/8 το έμβρυο να είναι θήλυ πάσχον καθώς και η απότομη διακοπή της επί υγιούς εμβρύου ενδέχεται να περιέχει κάποιους κινδύνους όπως διαταραχή της φυσιολογίας του εμβρύου, ανάπτυξη συγγενών ανωμαλιών – υδροκέφαλος, καρδιοπάθεια - ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης και απώτερες επιπτώσεις στη μνήμη, νευροψυχολογία και γενικώς εγκεφαλική λειτουργία (179-181). Είναι καθολικά αποδεκτό ότι η προγεννητική θεραπεία, ένεκα των κινδύνων που εμπεριέχει και των ηθικών προβληματισμών και διλημμάτων που προκύπτουν όπως πραγματοποιείται σε ερευνητικό πρωτόκολλο από οργανωμένα κεντρα, που διαθέτουν υποδομή με τη σωστή επιλογή ασθενών για αποφυγή λαθών που ενδέχεται να προκύψουν από εσφαλμένη αξιολόγηση των ευρημάτων από τη μοριακή ανάλυση και μακροχρόνια παρακολούθηση για τυχόν εμφάνιση απώτερων επιπλοκών (182-185).

Η πιο συνήθης περίπτωση προγεννητικής θεραπείας είναι στις μητέρες που έχουν ήδη γεννήσει πάσχον παιδί με ΣΥΕ. Η πιθανότητα στις γυναίκες με την κλασσική μορφή ΣΥΕ να γεννήσουν θήλυ παιδί που πάσχει, όταν ο γονότυπος του πατέρα δεν είναι γνωστός, είναι 0.4% ή 1/250, αφού η συχνότητα φορέων συνήθως στο γενικό πληθυσμό είναι 1.6% (ισοδύναμη με τη συχνότητα νόσου 1/16,000 υπολογιζόμενη με την εξίσωση ([1 γονέας φέρει 2 αλλήλια ΣΥΕ] × [1.6% η συχνότητα των φορέων στο γενικό πληθυσμό] × [1/2 η πιθανότητα να κληρονομήσει το έμβρυο το προβληματικό αλλήλιο από το φορέα γονέα] × [1/2 πιθανότητα το βρέφος να είναι θήλυ]) (5).

Μητέρες με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ έχουν επίσης πιθανότητα να γεννήσουν παιδί με κλασσική μορφή επειδή σε ποσοστό 50% ενδέχεται να είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες και να φέρουν ένα αλλήλιο της σοβαρής μορφής και ο πατέρας να είναι ετεροζυγώτης επίσης για τη σοβαρή μορφή, με πιθανότητα 0.1% (1/1000) βάσει της εξίσωσης ([50% πιθανότητα η μητέρα με τη μη κλασσική μορφή να φέρει αλλήλιο της κλασσικής μορφής] × [1.6% συχνότητα φορέων στο γενικό πληθυσμό] × [1/4 πιθανότητα το έμβρυο να κληρονομήσει και τα δύο αλλήλια της σοβαρής μορφής] × [1/2 πιθανότητα το έμβρυο να είναι θήλυ]) (154).

Επειδή στα πιο πάνω σενάρια η πιθανότητα να κυφορείται πάσχον θήλυ με κλασσική μορφή ΣΥΕ είναι πολύ πιο μικρή από την αναμενόμενη 1/8, επιβάλλεται να γίνει γονοτυπικός έλεγχος του πατέρα για υπολογισμό της ακριβούς πιθανότητας και αποφυγή αχρείαστης θεραπείας. Η ταυτοποίηση συνεπώς της γενετικής βλάβης όχι μόνο είναι το ουσιώδες εργαστηριακό εργαλείο για την επιβεβαίωση της διάγνωσης αλλά αποτελεί και τη θεμελιώδη γνώση για παροχή ορθολογιστικής γενετικής συμβουλής.

8. Σκοπός της μελέτης

Δεν υπάρχουν καθόλου δεδομένα αναφορικά με το είδος των μεταλλάξεων στο γονίδιο *CYP21A2* στον Κυπριακό πληθυσμό, ο οποίος είναι κυρίως Ελληνικής καταγωγής με επηρεαζόμενες προσμίξεις γειτονικών λαών. Ως εκ τούτου σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι :

1. Η ταυτοποίηση των μεταλλάξεων, οι οποίες χαρακτηρίζουν τους Κυπρίους πάσχοντες με τις διάφορες μορφές της ΣΥΕ
2. Η ανεύρεση συσχέτισης του υποκείμενου γονότυπου με την κλινική έκφραση της νόσου
3. Η αναγνώριση και σημασία της ετεροζυγωτίας του γονιδίου *CYP21A2* σε θήλεις με κλινική υπερανδρογοναιμία και τέλος
4. Η αναγνώριση του φάσματος και της συχνότητας των μεταλλάξεων στον γενικό πληθυσμό της Κύπρου.

ειδικό μέρος

1. Υλικό και μέθοδοι

A. Ασθενείς

Για τους σκοπούς της διδακτορικής αυτής διατριβής μελετήθηκαν 218 ασθενείς, οι οποίοι προέρχονταν από την Παιδοενδοκρινολογική Μονάδα, Παιδιατρικό Τμήμα και το Ενδοκρινολογικό Τμήμα του Νοσοκομείου Αρχιεπισκόπου Μακαρίου ΙΙΙ στη Λευκωσία. Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν σποραδικοί Ελληνοκύπριοι ασθενείς (παιδιά, έφηβες και γυναίκες) που έφεραν τη διάγνωση της ΣΥΕ είτε είχαν εκδηλώσει κλινική υπερανδρογοναιμία. Πιο συγκεκριμένα η μελέτη περιέλαβε:

A. 47 ασθενείς με ΣΥΕ, (10 με κλασσική μορφή και 37 με μη κλασσική μορφή) οι οποίοι έφεραν δυο παθολογικές μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A2*.

B. 66 θήλεις ασθενείς (19 κορίτσια παιδικής ηλικίας, 17 κορίτσια εφηβικής ηλικίας και 30 ενήλικες γυναίκες) με κλινική υπερανδρογοναιμία, οι οποίες έφεραν μια παθολογική μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2*.

Γ. 105 θήλεις ασθενείς (28 κορίτσια παιδικής ηλικίας, 13 κορίτσια εφηβικής ηλικίας και 64 ενήλικες γυναίκες) με κλινική υπερανδρογοναιμία, οι οποίες δεν έφεραν καμία παθολογική μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2*.

Η κατάταξη των ασθενών με ΣΥΕ στους διάφορους τύπους έγινε με βάση τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα.

1. Τα βρέφη με τη μορφή απώλειας άλατος είχαν κλινικά και βιοχημικά ευρήματα επινεφριδιακής ανεπάρκειας (ανεπαρκή πρόσληψη βάρους, υπονατρία, υπερχαλαιμία) και επιπλέον τα θήλεα πάσχοντα είχαν

αμφίβολα γεννητικά όργανα. Η ανεύρεση υψηλών επιπέδων ρενίνης (PRA), 17-ΟΗΠ και ACTH ήταν παθολογική.

2. Η απουσία ηλεκτρολυτικών διαταραχών σε θήλεα νεογνά με αμφίβολα γεννητικά όργανα ή σε άρρενα παιδιά με σημεία περιφερικής πρώιμης εφηβείας και η ανεύρεση υψηλών επιπέδων 17-ΟΗΠ, με φυσιολογική/υψηλή PRA ήταν χαρακτηριστικά στους ασθενείς με την απλή αρρενοποιητική μορφή.
3. Συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας στην περιεφηβική περίοδο (πρώιμη αδρεναρχή, ακμή, δασυτρυχισμός, με ή χωρίς ανωμαλίες του καταμήνιου κύκλου) και αυξημένα επίπεδα 17-ΟΗΠ μετά από διέγερση με 250 μg ACTH (1-24) χαρακτήριζαν τους ασθενείς με την μη κλασσική μορφή. Ασθενείς της τελευταίας ομάδας συχνά είχαν αυξημένη και την βασική τιμή της 17-ΟΗΠ μεγαλύτερη των 15 nmol/L, (συχνά > 60.5 nmol/l πιθανόν λόγω του στρες της αιμοληψίας).
4. Συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας στην περιεφηβική περίοδο και επίπεδα 17-ΟΗΠ μετά από διέγερση με 250 μg ACTH (1-24) χαμηλότερα των 30 nmol/l, χαρακτήριζαν τους ετεροζυγώτες ασθενείς με την μη κλασσική μορφή και αυτούς που δεν αναμενότανε να είχανε καμία παθολογική μετάλλαξη (φυσιολογικοί).
5. Ως κλινικά συμπτώματα υπερανδρογοναιμίας θεωρούνται :
 - A. πρώιμη εμφάνιση τρίχωσης στο εφήβαιο πριν από την ηλικία των 8 χρόνων (πρώιμη αδρεναρχή) στην παιδική ηλικία (186).

Β. Σοβαρή ακμή με ή χωρίς διαταραχές του καταμήνιου κύκλου (αραιομηνόρροια – λιγότερο από 6 κύκλοι ετησίως) με ή χωρίς δασυτρυχισμό (βαθμολογία βάσει τροποποιημένης κλίμακας Ferriman Gallaway > 8) στην εφηβική και μετέπειτα ηλικία (187).

Γ. Για την κατάταξη των εφήβων τουλάχιστον 2 χρόνια μετά την ηλικία εμμηναρχής και γυναικών σε πάσχουσες με Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών (PCOS) χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια της Androgen Excess and PCOS Society: 1. υπερανδρογοναιμία {κλινική και/ή βιοχημική}, 2. ωοθηκική δυσλειτουργία {ολιγο-ανωορρηξία και/ή πολυκυστική απεικόνιση ωοθηκών} και 3. αποκλεισμός άλλης σχετικής πάθησης (188).

Για την ομάδα των μαρτύρων χρησιμοποιήθηκαν 300 ενήλικες (150 άρρενες και 150 γυναίκες) Ελληνοκυπριακής καταγωγής, οι οποίοι προσέρχονταν στο κέντρο Θαλασσαιμίας για έλεγχο. Ο έλεγχος για την εξακρίβωση φορέων στίγματος Θαλασσαιμίας είναι υποχρεωτικός για την έκδοση πιστοποιητικού για να τελεσθεί το μυστήριο του γάμου στην Εκκλησία. Η μελέτη είχε την έγκριση της Εθνικής Εταιρείας Βιοηθικής και έντυπα συγκατάθεσης υπεγράφησαν από όλους τους συμμετάσχοντες και κηδεμόνες.

B. Κατηγοριοποίηση ασθενών βάσει υποκείμενης μετάλλαξης

Οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ομάδες ανάλογα με το είδος του υποκείμενου γονότυπου και της συνεπαγόμενης ενζυματικής δραστηριότητας της 21 – Υδροξυλάσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (21).

Η ομάδα null περιέχει αλληλία, τα οποία οδηγούν σε ανύπαρκτη ενζυματική δραστηριότητα (κλασσικές γνωστές μεταλλάξεις: μεγάλες απαλείψεις, p.Phe306insT, και p.Qln318stop (143, 189, 190). Η ομάδα A περιλαμβάνει γονότυπους από την μετάλλαξη IVS2-13A/C>G σε ομοζυγωτία ή σε ετεροζυγωτία με μετάλλαξη της ομάδας null. Η μετάλλαξη IVS2-13A/C>G οδηγεί σε ελάχιστη ενζυματική δραστηριότητα (124, 191).

Η ομάδα B περιέχει γονότυπους που αποτελούνται από την μετάλλαξη p.Ile172Asn σε ομοζυγωτία ή σε ετεροζυγωτία με μετάλλαξη από τις ομάδες null ή A σε συνδυασμό. Η ενζυματική δραστηριότητα της p.Ile172Asn, σε *in vitro* έκφραση είναι περίπου 2% (122).

Η ομάδα C περιλαμβάνει γονότυπους με ήπια μετάλλαξη τουλάχιστον στο ένα αλληλίο όπως p.Val281Leu, p.Pro30Leu or p.Pro482Ser. Το άλλο αλληλίο φέρει ήπια ή σοβαρή μετάλλαξη, η οποία ανήκει στις ομάδες null, A ή B. Οι ήπιες μεταλλάξεις p.Val281Leu, p.Pro30Leu, p.Pro453Ser and p.Pro482Ser οδηγούν σε 30 με 60% ενζυματική δραστηριότητα (150).

Οι γονότυποι των ομάδων null και A, οδηγούν στην κλασσική μορφή με απώλεια άλατος, αυτοί της ομάδας B στην κλασσική απλή αρρενοποιητική μορφή, ενώ οι γονότυποι της ομάδας αναμένεται να εκδηλωθούν κλινικά ως μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ.

Γ. Απομόνωση του DNA

Από κάθε άτομο που μετείχε στη μελέτη συλλέχθηκε 2 ml περιφερικού αίματος σε μπουκάλι που περιείχε 0.5 ml EDTA (0.11 M). Για την απομόνωση του DNA από

περιφερικό αίμα χρησιμοποιείται το DNA purification kit QIAamp Blood Midi Kit από την εταιρεία QIAGEN, GmbH D-40724, Γερμανία.

Δ. Παραγωγή του γονιδίου CYP21A2 με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης παράγονται πολλά αντίγραφα της κωδικοποιούσας περιοχής του γονιδίου CYP21A2 που μας ενδιαφέρει ώστε να μπορέσουμε με διάφορες άλλες μεθόδους να το παρατηρήσουμε.

Αρχικά σχεδιάστηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές για τα εξόνια η ακόμα και για άλλες περιοχές (π.χ. προμότερες, 5' UTR, 3' UTR) του υπό εξέταση CYP21A2 γονιδίου με τη βοήθεια του προγράμματος σχεδίασης εκκινητών *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Σε θερμοανθεκτικό σωλήνα PCR (0.2 ml) προστίθενται 50-500 ng DNA από τους υπό εξέταση ασθενείς. Στη συνέχεια φτιάχνουμε μείγμα με τα υπόλοιπα αντιδραστήρια. Στο μείγμα προσθέτουμε για κάθε αντίδραση 10 pmoles (forward and reverse), 2 μl 10X buffer, 2 μl dNTPs (μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP με αρχική συγκέντρωση 200 μM), 0.2 μl (1 Unit) Qiagen Taq Polymerase. Στη συνέχεια ο σωλήνας αυτός τοποθετείται σε μηχανήμα θερμικού κυκλοποιητή (PCR machine) στο οποίο ρυθμίζεται το κατάλληλο πρόγραμμα. Το πρόγραμμα που ακολουθείται περιλαμβάνει τα εξής στάδια: Αρχικά γίνεται αποδιάταξη του αρχικού δίκλωνου DNA σε θερμοκρασία 95 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έχουμε την κυκλική επανάληψη τριών σταδίων για 30 φορές. Στο πρώτο στάδιο κάθε κύκλου γίνεται αποδιάταξη του αρχικού κλώνου DNA σε θερμοκρασία 94 °C για 45 δευτερόλεπτα. Στο δεύτερο στάδιο

γίνεται υβριδισμός των εκκινητών με στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA, ο οποίος πραγματοποιείται σε θερμοκρασία μεταξύ 55-62 °C (ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνται) για 45 δευτερόλεπτα. Στο τρίτο στάδιο και αφού η πολυμεράση έχει συνδεθεί με στο υβρίδιο του εκκινητή και της μονοκλωνικής αλυσίδας, αρχίζει η σύνθεση του DNA με επιμήκυνση των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5' προς 3'. Η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C για 45 δευτερόλεπτα. Στο τέλος του πρώτου κύκλου το προϊόν της επιμήκυνσης αποτελεί επίσης υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο. Τέλος έχουμε το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης το οποίο λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία 72 °C για 10 λεπτά. Με το τέλος της αντίδρασης ποσότητα από το τελικό προϊόν που παράγεται ηλεκτροφορείται σε αποδιατακτική πήκτη αγαρόζης για να αξιολογηθεί.

E. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR για περαιτέρω ανάλυση

Ο καθαρισμός των δειγμάτων που προκύπτουν από την PCR γίνεται με ενζυμική αντίδραση εξονουκλεάσης – αλκαλικής φωσφατάσης γαρίδας (ExoSap – exonuclease I, shrimp alkaline phosphatase), όπου το δείγμα καθαρίζεται από περίσσεια εκκινητών και ελευθέρων δεοξυνουκλεοτιδίων.

Στ. Προσδιορισμός της αλληλουχίας προϊόντων της PCR σε αυτόματο αναλυτή (ABI Sequencer)

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας προϊόντων της PCR συνδυάζει την κλασσική μέθοδο προσδιορισμού της πρωτοταγούς δομής του DNA του Sanger και τον

εκλεκτικό πολλαπλασιασμό των αλληλουχιών του μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Για την αντίδραση αυτή χρησιμοποιούνται εκτός των δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs) και τριφωσφορικά 2,3 - διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs - dye labeled terminators), από τα οποία απουσιάζει η υδροξυλική ομάδα στην τρίτη θέση της δεσοξυριβόζης που είναι απαραίτητη για το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού με το επόμενο δεοξυνουκλεοτίδιο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της σύνθεσης. Η διαδικασία προσδιορισμού αλληλουχίας εφόσον το προϊόν της PCR έχει ήδη καθαριστεί, ξεκινά με την κυκλική αντίδραση προσδιορισμού αλληλουχίας. Στη συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός των δειγμάτων με τη χρήση αιθανόλης και τέλος η ανάλυση της αλληλουχίας σε αυτόματο αναλυτή. Τα αποτελέσματα αναλύονται με το λογισμικό πρόγραμμα sequence analysis του ABI sequencer και η σύγκριση με τη φυσιολογική ακολουθία, την οποία βρίσκουμε καταχωρημένη στη βάση δεδομένων Ensembl (www.ensembl.org), γίνεται με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος Sequence Investigator της ABI.

H. Ανίχνευση Διπλασιασμών και Μεγάλων Απαλείψεων του γονιδίου CYP21A2

Η ανίχνευση διπλασιασμών και μεγάλων απαλείψεων του γονιδίου *CYP21A2* γίνεται με τη μέθοδο MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην υβριδοποίηση δυο ειδικών ανιχνευτών για κάθε περιοχή στόχο στο DNA οι οποίοι συνδέονται μεταξύ τους με την αντίδραση της λιγάσης. Οι ανιχνευτές περιέχουν ακολουθίες που αναγνωρίζονται από τους εκκινητές και ακολουθεί πολλαπλή αντίδραση της PCR με κοινό ζευγάρι

εκκινητών, οι οποίοι είναι σεσημασμένοι με φθορίζον χρωστική και αναγνωρίζονται από τους ανιχνευτές λόγω κοινής ακολουθίας. Στη συνέχεια διαχωρίζονται τα προϊόντα βάσει μεγέθους και μπορεί να γίνει σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό εξέταση δείγματος με φυσιολογικό πρότυπο. Η αντίδραση γίνεται με χρήση του *CYP21A2* – MLPA kit της εταιρείας MRC-Holland σε μηχανήμα PCR, στη συνέχεια αναλύεται σε αυτόματο αναλυτή ABI sequencer και τα αποτελέσματα επεξεργάζονται με τη χρήση του προγράμματος Coffalyzer της MRC-Holland, όπως φαίνεται στα σχήματα 1α και 1β.

Θ. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα SPSS, όπου για τη σύγκριση μεταξύ των ομάδων χρησιμοποιήθηκε το Student's t-paired test, με την τιμή $p < 0.05$ να θεωρείται στατιστικά σημαντική. Ο υπολογισμός της συχνότητας των των πέντε σοβαρών μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* στον Ελληνοκυπριακό πληθυσμό έγινε χρησιμοποιώντας τη διωνυμική προσέγγιση κατανομής {binomial distribution approximation} στα αποτελέσματα του ελέγχου των υγιών μαρτύρων, όπου υπολογίστηκε η σημειακή εκτίμηση της επίπτωσης και το ακριβές 95% διάστημα εμπιστοσύνης {Confidence Interval (CI)}. Οι αριθμοί και για τις δύο ομάδες υπολογίστηκαν βάσει του τρόπου μεταβίβασης (αυτόσωμος υπολειπόμενος) της νόσου.

2. Αποτελέσματα

A. 47 μη συσχετιζόμενοι ασθενείς με ΣΥΕ που έφεραν δυο μεταλλάξεις

1. Από τον συνολικό αριθμό των 218 ατόμων, τα οποία συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη υπήρχαν 47 ασθενείς οι οποίοι με βάση τα κλινικά και βιοχημικά ευρήματα διαγνώστηκαν με ΣΥΕ. Η συνολική συχνότητα των γενετικών λαθών, τα οποία αναγνωρίστηκαν στους 47 μη συσχετιζόμενους ασθενείς, των οποίων μελετηθήκανε 94 αλληλίες απεικονίζονται στον πίνακα 1. Οι πιο συχνές σημειακές μεταλλάξεις βρέθηκαν να είναι οι p.Val281Leu (54.8%) και IVS2-13A/C>G (14.9%). Στην ομάδα των ασθενών, οι οποίοι είχαν την κλασσική μορφή η πιο συχνή σημειακή μετάλλαξη ήταν η IVS2-13A/C>G (52.4%), ακολουθούμενη από μεγάλες απαλείψεις (19.0%), σε αντιδιαστολή με την ομάδα των ασθενών με την μη κλασσική μορφή όπου το πιο εμφανές γενετικό λάθος ήταν η μετάλλαξη p.Val281Leu (70.8%), ακολουθούμενη από τις IVS2-13A/C>G, p.Qln318stop και p.Val304Met με συχνότητα έκαστη 4.1%.
2. Ο τύπος των γενετικών λαθών στους 10 ασθενείς με την κλασσική μορφή φαίνεται στον πίνακα 2, όπου επίσης παρουσιάζονται τα αντίστοιχα κλινικά και βιοχημικά ευρήματα. Πέντε εκ των δέκα ασθενών ήταν ομοζυγώτες στην μετάλλαξη IVS2-13A/C>G και ένας ασθενής έφερε σε ομοζυγωτία μεγάλες απαλείψεις του γονιδίου. Οι υπόλοιποι τέσσερις έφεραν σε συνδυασμό σύνθετους γονότυπους σε ετεροζυγία αποτελούμενους από σοβαρές μεταλλάξεις, όπως μεγάλες απαλείψεις και τις p.Qln318stop, IVS2-13A/C>G

και p.Phe306insT. Ένα κοριτσάκι , που έπασχε με την μορφή με απώλεια άλατος αναγνωρίστηκε να φέρει τον σπάνιο γονότυπο pPhe306insT+p.Val281Leu/p.Phe306insT+p.Val281Leu, ο οποίος αναγνωρίστηκε και στα δύο (μητρικό και πατρικό) αλληλία. Οι γονείς αν και δεν φαίνεται να έχουν κάποια συγγένεια μεταξύ τους, κατάγονται από το ίδιο χωριό της Κύπρου. Η μετάλλαξη p.Ile172Asn αναγνωρίστηκε σε ομοζυγία σε αγόρι, το οποίο προέβαλε με σημεία πρώιμης σεξουαλικής ωρίμανσης και τέθηκε η διάγνωση της μη εξαρτημένης από το GnRH ή περιφερικής πρώιμης εφηβείας (τρίχωση στο εφήβαιο, μεγέθυνση πέους, προεφηβικοί όρχεις 3 ml).

3. Η συνολική συχνότητα των μοριακών λαθών, που αναγνωρίστηκαν στην ομάδα των 37 μη συσχετιζόμενων ασθενών με την μη κλασσική μορφή ΣΥΕ, που αντιστοιχούσαν σε 74 αλληλία απεικονίζεται στον πίνακα 3, όπου εμφανώς φαίνεται ότι η πιο συχνή μετάλλαξη είναι η p.Val281Leu σε ποσοστό 68.9%. Η δεύτερη συχνή μετάλλαξη είναι η p.Pro453Ser (6.75%) ακολουθούμενη από τις IVS2-13A/C (4.05%), p.Qln318stop (4.05%), p.Val304Met (4.05%), p.Met283Val (2.7%), p.Pro482Ser (2.7%), p.Pro30Leu (2.7%), p.Pro30Leu+IVS2-13A/C (1.35%), p.Ile172Asn (1.35%) και μεγάλη απάλειψη του DNA (1.35%).
4. Στην προσπάθεια συσχέτισης της σοβαρότητας της υποκείμενης μοριακής βλάβης, της κλινικής εκδήλωσης και των εργαστηριακών ευρημάτων, οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο γονοτυπικές ομάδες με βάση την σοβαρότητα της μεταλλαγμένων αλληλίων (ήπια/ήπια και ήπια/σοβαρή).

A. Στην ομάδα A (πίνακας 4) υπήρχαν 29 ασθενείς οι οποίοι βρέθηκαν να είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες με δύο ήπιες μεταλλάξεις (ήπιος /ήπιος γονότυπος). Στην ομάδα αυτή 14 ασθενείς (11 θήλεις και 3 άρρενες) εκδήλωσαν πρώιμη αδρεναρχή και η διάγνωση τέθηκε κατά την παιδική ηλικία. Στις υπόλοιπες 15 θήλεις ασθενείς η διάγνωση τέθηκε στην εφηβεία και μετέπειτα όταν παρουσίασαν σημεία υπερανδρογοναιμίας. Στην υποομάδα των 14 εφήβων με τον ήπιο/ήπιο γονότυπο , το Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών ήταν η πιο συχνή κλινική εκδήλωση (8/14), ακολουθούμενη (5/14) από δασυτρυχισμό σύμφωνα με την βαθμολογία της κλίμακας Ferriman Gallwey.

B. Οι ασθενείς στην ομάδα B , που έφεραν συνδυασμό ήπιας/σοβαρής μετάλλαξης (πίνακας 5) σε μεγαλύτερο ποσοστό εκδήλωσαν τη νόσο πριν από την εφηβεία αφού 5 από τα 8 κορίτσια εμφάνισαν πρώιμη αδρεναρχή. Ο συνδυασμός κλασσική/μη κλασσική μορφή γονότυπος αναγνωρίστηκε σε 8 ασθενείς, όπου ενδεικτικά μερικοί από αυτούς εμφάνισαν σοβαρότερη κλινική εικόνα με σημεία αρρενοποίησης.

Η ασθενής {# 1} με τον γονότυπο IVS2-13A/C/V281L εκδήλωσε σοβαρή μορφή μη κλασσικής μορφής. Η αρχική εξέταση έγινε σε ηλικία 6.5 χρόνων με ιστορικό πρώιμης αδρεναρχής από την ηλικία των 4 χρόνων. Το κορίτσι είχε ανάστημα 131.5 cm (+2.6 SD) με προχωρημένη οστική ηλικία που αντιστοιχούσε σε 12 χρόνια κατά Gleulich and Pyle και η φυσική εξέταση έδειξε ακμή και σημεία ήπιας αρρενοποίησης (κλειπορομεγαλία). Η βασική τιμή της 17 – ΟΗΠ ήτανε μεγαλύτερη των

60.5 nmol/l, με αυξημένα επίπεδα Ανδροστενεδιόνης Δ4 (6 ng/ml), Τεστοστερόνης (4.2 nmol/l) και οριακά επίπεδα ACTH (65 pg/ml).

Το κορίτσι {# 2} με τον γονότυπο p.Pro30Leu/IVS2-13A/C εκδήλωσε σοβαρή μορφή της μη κλασσικής μορφής με πρώιμη αδρεναρχή στην ηλικία των 4 χρόνων και κλειτορομεγαλία. Στην ηλικία των 6 χρόνων είχε ανάστημα 131.5 cm (+ 2.6 SD) και προχωρημένη οστική ηλικία 12 χρόνων κατά Gleulich and Pyle. Η βασική τιμή της 17-OHP ήτανε μεγαλύτερη των 60.5 nmol/L, η Ανδροστενεδιόνη ήτανε 11 ng/ml, η Τεστοστερόνη 9.6 nmol/L και οριακά αυξημένη η ACTH 71 pg/mL με φυσιολογικό για την ηλικία και στάδιο εφηβείας DHEAS: 17.2 nmol/L.

Ο μη συνήθης απλότυπος p.Pro30L+IVS2-13A/C/p.Ile172Asn αναγνωρίστηκε σε κοριτσάκι {# 3} που παρουσίασε πρώιμη αδρεναρχή σε ηλικία 7 χρόνων, χωρίς επιτάχυνση της οστικής ωρίμανσης με επίπεδα 17 – OHP >60.5 nmol/l.

5. Λόγω του μικρού αριθμού των ασθενών στην ομάδα B, δεν μπορούσε να γίνει συγκριτική στατιστική ανάλυση των επιπέδων των ανδρογόνων, όμως η βασική τιμή της 17-OHP ήτανε μεγαλύτερη του εργαστηριακού ορίου των 60.5 nmol/l σε 75 % των ασθενών με τον ήπιο/σοβαρό γονότυπο σε αντιδιαστολή με 37.9% των σθενών της ομάδας A. Στο σύνολο των ασθενών με την μη κλασσική μορφή η χαμηλότερη βασική τιμή 17 – OHP 4.5 nmol/l βρέθηκε σε ασθενή της ομάδας A {# 28}, που έφερε τον γονότυπο p.Val281Leu/ p.Val304Met και οι χαμηλότερες τιμές 17 – OHP (30.6 και 37.8 nmol/l) στα 60 λεπτά μετά από διέγερση με ACTH βρέθηκαν επίσης σε

ασθενείς της ομάδας A {# 3 και # 4} με τον γονότυπο p.Val281Leu/p.Val281Leu και p.Val281Leu/p.Pro453Ser αντίστοιχα.

6. Όπως φαίνεται στον πίνακα 6, η μέση τιμή βασικής Τεστοστερόνης σε έφηβες και ενήλικες γυναίκες με τον ήπιο/ήπιο και ήπιο/σοβαρό γονότυπο ήτανε 2.64 nmol/l (SD± 0.94) και 3.87 nmol/L (SD± 0.3) αντίστοιχα χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά (p: 0.068). Στην ίδια υποομάδα των ασθενών η μέση τιμή της Δ4 στον ήπιο/ήπιο γονότυπο ήτανε 4.9 ng/ml (SD±1.96) και για τον ήπιο/σοβαρό γονότυπο 7.5 ng/ml (SD±3.53), με τιμή p: 0.15. Η μέση τιμή Τεστοστερόνης και Ανδροστενεδιόνης στα κορίτσια με ήπιο/ήπιο γονότυπο ήτανε 1.64 ng/ml (SD±1.3) και 1.86 ng/ml (SD±1.0) αντίστοιχα ενώ στα κορίτσια με ήπιο/σοβαρό γονότυπο ήτανε 5.55 (SD±3.6) και 7.85 ng/ml (SD±3.6) αντίστοιχα με στατιστικά σημαντική διαφορά (p< 0.05).
7. Ακολούθησε ανάλυση της συσχέτισης γονότυπου/φαινότυπου βάσει της προβλεπόμενης ενζυματικής λειτουργίας της 21 – Υδροξυλάσης (πίνακας 7). Όλοι οι ασθενείς, οι οποίοι ανήκαν στην ομάδα null είχαν την μορφή με απώλεια άλατος όπως ήταν αναμενόμενο, όπως και οι ασθενείς της ομάδας A που εκδήλωσαν τη κλασσική μορφή. Ο μόνος ασθενής στην ομάδα B, που είχε την απλή αρρενοποιητική μορφή είχε και τον γονότυπο p.Ile172Asn/ p.Ile172Asn. Όλοι οι ασθενείς της ομάδας C εκδήλωσαν την μη κλασσική μορφή, όπως αναμενότανε. Η συνολική συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου στην παρούσα φάση της μελέτης ήτανε 100%.

B. Ανάλυση του γονότυπου CYP21A2 σε 171 θήλεις με κλινική υπερανδρογοναιμία

B1. Αναγνώριση μίας μετάλλαξης σε 66 θήλεις

Η συνολική συχνότητα των μοριακών λαθών, τα οποία αναγνωρίστηκαν στην ομάδα των 66 θηλέων με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας οι οποίες βρέθηκαν να έχουν μία μετάλλαξη του γονιδίου CYP21A2 φαίνεται στον πίνακα 8. Η πιο συχνή μετάλλαξη στα 66 μη συσχετιζόμενα αλληλία ήταν η p.Val281Leu (53.0%), ακολουθούμενη από τις p.Qln318stop (18.2%), p.Pro482Ser (10.6%), p.Val304Met (6.1%), p.Pro453Ser (6.1%), p.Ala391Thr (1.5%), μεγάλες απαλείψεις/μετατροπές των εξονίων 1-4 (1.5%) και 6-8 (1.5%) και η μεγάλη απάλειψη 8bpdelE3 (1.5%).

1. Η αναγνώριση των γενετικών λαθών στο γονίδιο CYP21A2 σε 19 κορίτσια με πρώιμη αδρεναρχή φαίνεται στο σχήμα 2. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία, ήταν οι εξής: p.Val281Leu (54.3%), p.Qln318stop (20%), p.Pro453Ser (20%), p.Val304Met (2.8%), delEX6-8 (2.8%) και μεγάλες απαλείψεις/μετατροπές εξονίων 1-4 (2.8%).
2. Η αναγνώριση των γενετικών λαθών στο γονίδιο CYP21A2 σε 17 έφηβες και με υπερανδρογοναιμία φαίνεται στο σχήμα 3. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις σε ετεροζυγωτία, ήταν οι εξής: p.Val281Leu (47%), p.Qln318stop (29%), p.Val304Met (29%), p.Pro435Ser (11.7%) και p.Pro482Ser (11.7%).
3. Η αναγνώριση των γενετικών λαθών στο γονίδιο CYP21A2 σε 30 γυναίκες με υπερανδρογοναιμία φαίνεται στο σχήμα 4. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις σε

ετεροζυγωτία, ήταν οι εξής: p.Val281Leu (50%), p.Qln318stop (16.6%), p.Pro482Ser (16.6%), p.Pro453Ser (6.6%) p.Val304Met (3.3%), p.Ala391Thr (3.3%) και μεγάλες απαλείψεις/μετατροπές εξονίων 1-4 (3.3%).

Στο σύνολο των 47 ετεροζυγωτών θηλέων εφήβων και γυναικών η πιο συνήθης κλινική εκδήλωση ήταν διαταραχή της εμμήνου ρύσεως (ολιγομηνόρροια) είτε ως μοναδικό σύμπτωμα είτε στο πλαίσιο του PCOS (32/47), και ακολούθως απλά δασυτρυχισμός (Ferriman Gallwey βαθμολογία > 8) με ή χωρίς ακμή χωρίς διαταραχές εμμήνου ρύσεως (21/47). Υψηλότερες τιμές 17-OHP μετά από ACTH ανευρέθηκαν στην ομάδα που έφεραν την μετάλλαξη p.Val281Leu συγκριτικά με τις υπόλοιπες, που έφεραν άλλες μεταλλάξεις (μέση τιμή: 17-OHP 24.7 nmol/l vs 15.6 nmol/l; P=0.02). Το εύρημα αυτό υποστηρίζει την ήδη γνωστή άποψη ότι φορείς της ήπιας μετάλλαξης p.Val281Leu έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για εκδήλωση υπερανδρογοναιμίας.

B2. Μη αναγνώριση μετάλλαξης σε 105 θήλεις

Οι 105 θήλεις από το σύνολο των 171 με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας, στις οποίες δεν αναγνωρίστηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* είχαν ασυνήθιστα υψηλή συχνότητα 56.1% (59/105) του πολυμορφισμού p.Asn493Ser στο αλληλίο τους συγκριτικά με τους μάρτυρες 37%(111/300) (p<0.0001). Η αλληλική συχνότητα του πολυμορφισμού p.Asn493Ser βρέθηκε να είναι 19.7 % (13/66) στην ομάδα των 66 *CYP21A2* ετεροζυγωτών θηλέων, στατιστικά σημαντική τόσο συγκρινόμενη με τους μάρτυρες (p<0.01) όσο και με την ομάδα

των θηλέων χωρίς μετάλλαξη ($p < 0.0001$). Στην υποομάδα των 28 κοριτσιών με πρώιμη αδρεναρχή, τα οποία δεν έφεραν καμία μετάλλαξη, η συχνότητα του αλληλίου με τον πολυμορφισμό *p.Asn493Ser* αναγνωρίστηκε σε ποσοστό 64.2% (18/28) στατιστικά σημαντική συγκρινόμενη τόσο με τους μάρτυρες ($p = 0.008$), όσο και με το ποσοστό 26.3% που αναγνωρίστηκε σε 5 άτομα από την ομάδα των 19 ετεροζυγωτών ($p = 0.02$). Στο δείγμα των 300 Ελληνοκυπρίων υγιών μαρτύρων η συχνότητα των φορέων της παραλλαγής *p.Asn493Ser* εκτιμάται να είναι 37% - σχήμα 5.

Από το σύνολο των 64 κοριτσιών που είχαν ως κλινική προβολή τη πρώιμη αδρεναρχή, 17 (26.6%) διαγνώστηκαν με μη κλασική μορφή ΣΥΕ και έφεραν δυο μεταλλάξεις, 19 (28.7 %) αναγνωρίστηκαν ως ετερόζυγες με μία μετάλλαξη και 28 (43.7 %) δεν έφεραν καμία γενετική βλάβη στο μεταφραζόμενο μέρος του γονιδίου *CYP21A2*. Αντιθέτως στην ομάδα των 141 θηλέων με όψιμη κλινική προβολή στην εφηβεία και μετέπειτα η ταυτοποίηση 2 μεταλλάξεων έγινε σε 17 ασθενείς (12%), μίας μετάλλαξης σε 47 (33.4%) και καμίας σε 77 (54.6%) - σχήμα 6.

B3. Πολυμορφισμοί σε μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου *CYP21A2* (promoter/5'UTR και 3'UTR)

Η αλληλούχιση της μη μεταφραζόμενης περιοχής 3'UTR του γονιδίου *CYP21A2* στις 66 θήλεις με ένα επηρεασμένο αλληλίο *CYP21A2* στην παρούσα μελέτη έδειξε ότι οι 29, οι οποίες έφεραν σε ετεροζυγωτία την παρανοηματική μετάλλαξη

p.Val281Leu έφεραν επίσης στην περιοχή 3'UTR *in cis* τους πολυμορφισμούς *52 T>C, *440 C>T και *443 T>C. Παρομοίως σε 9 άλλους ετεροζυγώτες με την σοβαρή μετάλλαξη p.Qln318stop ανευρέθηκε να φέρουν επίσης *in cis* τους πολυμορφισμούς *12 T>C and *52 C>T στην ίδια περιοχή του 3'UTR (πίνακας 9). Αντιθέτως η κατανομή και των δύο ομάδων πολυμορφισμών *52 T>C, *440 C>T, *443 T>C και *12 T>C, *52 C>T δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις υπόλοιπες 25 *CYP21A2* ετεροζυγώτες θήλεις στη παρούσα φάση.

Ταυτόχρονα μελέτη της αλληλουχίας του *CYP21A2* 3'UTR σε 150 υγιείς μάρτυρες από την δεξαμενή υγιών θηλέων μαρτύρων του ΙΝΓΚ οι οποίες δεν είχαν κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας και δεν έφεραν καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* ανέδειξε τον συνδυασμό των πολυμορφισμών *52 T>C, *440 C>T, *443 T>C σε 12/150 (8%) και *12 T>C, *52 C>T σε 8/150 (5.3%) στην περιοχή 3'UTR. Η εκτενής αλληλούχιση της περιοχής του *CYP21A2* promoter/5'UTR σε όλους τους ασθενείς και μάρτυρες δεν έδειξε κανένα ασυνήθη πολυμορφισμό ή συχνότητα.

Γ. Ασθενείς με σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A2*

Σε έντεκα μη συσχετιζομένους ασθενείς ή ετεροζυγώτες για την μη κλασσική μορφή ΣΥΕ αναγνωρίστηκε να φέρουν μη συνήθεις μεταλλάξεις όπως απεικονίζονται στον πίνακα 10, όπου φαίνεται η κλινική εκδήλωση και τα επίπεδα της 17 – ΟΗΠ πριν και μετά από διέγερση με ACTH. Οι ασθενείς #1, #2 και #3 έφεραν τη διάγνωση της μη κλασσικής ΣΥΕ, οι ασθενείς #4 με #8 ήτανε

ετεροζυγώτες και έφεραν μία μετάλλαξη συμβατή με την βιοχημική απάντηση της 17 – ΟΗΠ, οι ασθενείς # 9 και #10 έπασχαν από τη μη κλασσική μορφή και το νεογνό #11 είχε την κλασσική με απώλεια άλατος μορφή ΣΥΕ.

Οι σπάνιες γενετικές βλάβες που βρεθήκανε ήτανε η σημειακή p.Val304Met σε επτά άτομα, η p.Met283Val σε συνδυασμό με τη σοβαρή IVS2-13A/C και την ήπια p.Val281Leu σε δύο άτομα, η p.Ala391Thr σε ένα άτομο και ο συνδυασμός p.F306insT+ p.Val281Leu/ p.Phe306insT+ p.Val281Leu σε επίσης ένα άτομο. Η τυχόν παρουσία απαλείψεων του γονιδίου και μετατροπών αποκλείσθηκε με ανάλυση MLPA σε δείγματα DNA τόσο από τους ασθενείς όσο και από τους γονείς.

Ο γονότυπος p.Val281Leu /p.Val304Met αναγνωρίστηκε στις ασθενείς # 1, # 2 και # 3, οι οποίες έπασχαν από μη κλασσική μορφή ΣΥΕ με ηλικία διάγνωσης 25, 28 και 29 χρόνων αντίστοιχα. Στην ομάδα των ετεροζυγωτών η μετάλλαξη p.Val304Met αναγνωρίστηκε σε 4 άτομα. Η ανεύρεση της σπάνιας γενετικής βλάβης p.Val304Met σε επτά μη συσχετιζόμενους ασθενείς μας οδήγησε αρχικά στη μελέτη 194 μαρτύρων για εξακρίβωση της συχνότητας ετεροζυγωτών για την ανοηματική μετάλλαξη p.Val304Met αλληλίων στον Κυπριακό πληθυσμό, η οποία έδειξε ότι η φορεία για την συγκεκριμένη γενετική βλάβη διαπιστώθηκε να είναι 1 στους 49 ή σε ποσοστό 2.1%. Η παρουσία της p.Val304Met στους 4 από τους 194 μάρτυρες αναγνωρίστηκε με περιοριστική ενζυματική ανάλυση και επιβεβαιώθηκε με άμεση αλληλουχία του γονιδίου.

Δ. Συχνότητα φορέων μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* στον Κυπριακό πληθυσμό

Μέχρι τώρα η πραγματική εικόνα της συχνότητας φορέων για ΣΥΕ λόγω έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης δεν έχει μελετηθεί με εμπειριστατωμένη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *CYP21A2* σε συγκεκριμένο Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Στην παρούσα μελέτη έγινε ανίχνευση για μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2* και στον προμότορά του σε στατιστικά αξιόπιστο για τον πληθυσμό της χώρας δείγμα 300 κλινικά ασυμπτωματικών ατόμων (150 άνδρες και 150 γυναικών) με αλληλούχιση DNA και ανάλυση MLPA.

Η γονοτυπική ανάλυση του *CYP21A2* απεκάλυψε 32 άρρενα και 27 θήλυ μεταλλαγμένα αλληλία δίνοντας μια συχνότητα φορέων 9.83% (~1:10) όπως απεικονίζεται στον πίνακα 11. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν στον ανιχνευτικό αυτό έλεγχο ήταν η ήπια p.Val281Leu (4.3%), ακολουθούμενη από τις p.Qln318stop (2.5%), p.Pro453Ser (1.33%), p.Val304Met (0.83%), p.Pro482Ser (0.67%) και p.Met283Val (0.17%). Επιπρόσθετα η συχνότητα των αλληλίων που έφεραν τον πολυμορφισμό p.Asn493Ser βρέθηκε να είναι σε ποσοστό 37.2%. Καμία μετάλλαξη δεν αναγνωρίστηκε στον προμότορα του *CYP21A2*, στις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του γονιδίου. Επιπρόσθετη γονοτυπική ανάλυση των 300 μαρτύρων με τη μέθοδο MLPA δεν αναγνώρισε καμία μεγάλη απάλειψη ή/και μετατροπή του εν λόγω γονιδίου. Η συνολική επίπτωση της μετάλλαξης p.Val281Leu ήταν η υψηλότερη τόσο στα άρρενα όσο και στα θήλυ αλληλία – σχήμα 7.

Οι σοβαρές πέντε μεταλλάξεις [p.Pro30Leu, p.F306insT+p.Val281Leu, p.Ile172Asn, μεγάλες απαλείψεις και IVS2-13A/C>G (c.655A/C>G)], οι οποίες αναγνωρίστηκαν στους 11 ασθενείς (10 με κλασσική μορφή και 1 με σοβαρή μη κλασσική μορφή) της παρούσας μελέτης δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τους υγιείς μάρτυρες. Χρησιμοποιώντας τη διωνυμική προσέγγιση κατανομής η σημειακή εκτίμηση της επίπτωσης βρέθηκε να είναι 0% με 95% ακριβές διάστημα εμπιστοσύνης (CI) μεταξύ 0% and 1.22% όπως απεικονίζεται στον πίνακα 12. Το γεγονός ότι καμία σοβαρή μετάλλαξη εκτός από την p.Qln318stop δεν αναγνωρίστηκε στο δείγμα των μαρτύρων εξηγεί και την σπανιότητα της κλασσικής μορφής της ΣΥΕ στον πληθυσμό μας, η οποία υπολογίζεται να είναι 1:30,000. Σε αντιδιαστολή η συχνότητα της ήπιας μη κλασσικής μορφής ΣΥΕ υπολογίζεται να είναι 1:400, επομένως συχνή, σύμφωνα πάντα με την αναγνώριση της συχνότητας 1:10 των αλληλικών φορέων του *CYP21A2*.

Πίνακας 1. Συχνότητα μεταλλάξεων σε 94 παθολογικά αλληλία από 47 μη συσχετιζόμενους ασθενείς με 21-OHD. * Η μετάλλαξη p.Phe306insT+p.Val281Leu εμπίπτει στην κατηγορία των πολλαπλών μεταλλάξεων επειδή αναγνωρίστηκε *in cis* στο ίδιο αλληλίο.

Μετάλλαξη	Αριθμός αλληλίων			% των αλληλίων		
	Κλασσική	Μη κλασσική	Σύνολο	Κλασσική	Μη κλασσική	Σύνολο
p.Val281Leu	0	51	51	0	70.8	54.8
IVS2-13A/C>G	11	3	14	52.4	4.1	14.9
Μεγάλη απάλειψη	4	1	5	19.0	1.4	5.3
p.Pro30Leu	0	2	2	0	2.8	2.1
p.Ile172Asn	2	1	3	9.5	0	3.2
p.Phe306insT+p.Val281Leu*	2	0	2	9.5	0	2.1
p.Qln318stop	1	3	4	4.8	4.1	4.2
p.Pro482Ser	0	2	2	0	2.8	2.1
p.Met283Val	0	2	2	0	2.8	2.1
p.Pro453Ser	0	5	5	0	7.0	5.3
p.Val304Met	0	3	3	0	4.1	3.2
p.Pro30Leu+ IVS2-13A/C>G	1	0	1	4.8	0	1.1
Σύνολο	21	73	94	100	100	100

Πίνακας 2. Ο τύπος των μοριακών βλαβών με τα κλινικά και βιοχημικά ευρήματα στους ασθενείς με κλασσική μορφή ΣΥ

	Γονότυπος	Μορφή	Φύλο	Ηλικία διάγνωσης	Κλινικός φαινότυπος	Υπονατρίαμια Υποκαλιαιμία	17 -OH Π nmol/l	ACTH < 60 pg/ml	Ρενίνη PRA ng/ml/hr (0.2 – 2.8)
1	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	SW	Θ	νεογνική	Prader 3	Ναι	>75.7	1450	10.3
2	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	SW	Θ	νεογνική	Prader 3	Ναι	>75.7	1355	9.4
3	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	SW	A	νεογνική	Επινεφριδιακή κρίση	Ναι	>75.7	>2100	11.4
4	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	SW	A	νεογνική	Επινεφριδιακή κρίση	Ναι	>75.7	> 2100	10.7
5	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	SV	A	5.5 χρόνων	Μη εξαρτώμενη από το GnRH πρώιμη εφηβεία	Όχι	43.7	282	1.23
6	IVS2-13A/C>G/Large lesion	SW	A	νεογνική	Επινεφριδιακή κρίση	Ναι	>75.7	2352	9.8
7	p.Phe306insT+p.Val281Leu/ p.Phe306insT+p.Val281Leu	SW	Θ	νεογνική	Prader 4	Ναι	>75.7	> 2100	12
8	Large lesion/ Large lesion	SW	A	νεογνική	Επινεφριδιακή κρίση	Ναι	>75.7	> 2100	8.5
9	Large lesion /p.Qln318stop	SW	A	νεογνική	Επινεφριδιακή κρίση	Ναι	>75.7	1680	11.3
10	p.Ile172Asn/p.Ile172Asn	SV	A	4.5 χρόνων	Μη εξαρτώμενη από τη GnRH πρώιμη εφηβεία	Όχι	>75.7	392	8.2

Πίνακας 3. Συχνότητα μεταλλάξεων σε 74 παθολογικά αλληλία των 37 μη συσχετιζόμενων ασθενών με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ

Είδος μετάλλαξης	Αριθμός αλληλίων	% αλληλίων
	Σύνολο 74	Σύνολο 100
Ήπιες μεταλλάξεις		
p.Val281Leu	51	68.9
p.Pro453Ser	5	6.75
p.Pro30Leu	2	2.7
p.Val304Met	3	4.05
p.Met283Val	2	2.7
p.Pro482Ser	2	2.7
p.Pro30Leu+IVS2-13A/C	1	1.35
Σοβαρές μεταλλάξεις		
IVS2-13A/C	3	4.05
p.Qln318stop	3	4.05
p.Ile172Asn	1	1.35
Large DNA lesion	1	1.35

Πίνακας 4. Ομάδα Α: Κλινικά σημεία, βασική και μετά από διέγερση με ACTH τιμή της 17-ΟΗΠ σε 29 ασθενείς με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ που έφεραν γονότυπο με ήπια/ήπια μετάλλαξη

Αρ.	Ηλικία διάγνωσης	Φύλο	Γονότυπος	17-ΟΗΠ, nmol/l, βασική	17-ΟΗΠ, nmol/l μετά από ACTH	Κλινική προβολή	Ολική Τεστοστερόνη nmol/l	DHEA-S ng/ml	Δ4 ng/ml
1	6	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	ΠΑ	0.97	0.18	0.8
2	7	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	ΠΑ	0.38	5.48	1.8
3	7	Θ	p.V281L/p.V281L	11.58	30.6	ΠΑ	1.5	4	0.5
4	7	Θ	p.V281L/p.P453S	17.5	37.8	ΠΑ	-	-	-
5	7	Θ	p.V281L/p.P453S	>60.5	>60.5	ΠΑ	1.39	2.52	2.6
6	7	Θ	p.V281L/p.V281L	17	>60.5	ΠΑ	0.69	2.77	0.9
7	7	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	ΠΑ	2.26	6.9	3.13
8	7	Θ	p.V281L/p.V281L	20.3	>60.5	ΠΑ, Α	2.7	4.23	3.08
9	8	Θ	p.V281L/p.P453S	33	>60.5	ΠΑ	-	-	-
10	8	Θ	p.V281L/p.V281L	40.8	>60.5	ΠΑ	0.94	3.15	1.4
11	8	Θ	p.V281L/p.V281L	35.95	>60.5	ΠΑ, Α	4.74	4.24	2.6
12	8	Α	p.V281L/p.V281L	13.2	>60.5	ΠΑ	1.76	5.39	1.61
13	8	Α	p.V281L/p.V281L	9.04	>60.5	ΠΑ	0.69	3.15	1
14	9	Α	p.V281L/p.M283V	22.6	57.6	ΠΑ	0.69	2.42	-
15	9	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	ΠΑ	0.86	-	1.1
16	11	Θ	p.V281L/p.P453S	17.8	>60.5	Α, Δ	1.69	3.5	2.5
17	12	Θ	p.P30L/p.V281L	11.5	>60.5	Δ, ΙΜ, Α	3.29	5.83	1.6

18	14	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	Δ, IM, A	2.63	3.64	4.28
19	14	Θ	p.V281L/p.V281L	24.9	57.6	A, Δ	2.46	7.68	5.7
20	15	Θ	p.V281L/p.P482S	12.53	57.93	Δ	2.67	3.94	-
21	15	Θ	p.V281L/p.P482S	11.8	>60.5	PCOS, A,	2.83	4.64	6.7
22	15	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	PCOS	0.87	4.18	7
23	17	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	IM	3.34	-	-
24	17	Θ	p.V281L/p.V281L	>60.5	>60.5	PCOS, A	1.6	-	3.2
25	20	Θ	p.V281L/p.V304M	>60.5	>60.5	Δ	-	-	-
26	25	Θ	p.V281L/p.V281L	45	>60.5	PCOS	4.47	6.75	4.75
27	28	Θ	p.V281L/p.P453S	6.2	>60.5	PCOS	2.52	3.75	6.56
28	30	Θ	p.V281L/p.V304M	4.5	48.5	IM, ΥΓ	-	-	-
29	36	Θ	p.V281L/p.V304M	>60.5	>60.5	PCOS	3.31	6.43	6.8

ΠΑ = Πρώιμη Αδρεναρχή, PCOS = Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών, Δ = Δασυτρυχισμός, A = Ακμή, IM = Διαταραχές εμμήνου ρύσεως, ΥΓ = Υπογονιμότητα

Πίνακας 5. Ομάδα Β: Κλινικά σημεία, βασική και μετά από διέγερση με ACTH τιμή της 17-ΟΗΠ σε 8 ασθενείς με μη κλασσική μορφή ΣΥΕ που έφεραν γονότυπο με ήπια/σοβαρή μετάλλαξη.

No.	Ηλικία διάγνωσης	Φύλο	Γονότυπος	17-ΟΗΠ, nmol/l βασική	17-ΟΗΠ, nmol/l μετά από ACTH	Κλινική προβολή	Ολική Τεστοστερόνη nmol/l	DHEA-S ng/ml	Δ4 ng/ml
1	4	Θ	IVS2-13A/p.V281L	>60.5	>60.5	ΠΑ	4.14	3.59	5.96
2	4	Θ	p. P30L/IVS2-13A/C	>60.5	>60.5	ΠΑ	9.6	17.2	11
3	7	Θ	p.P30L+IVS2-13A/C/p.P172N	>60.5	>60.5	ΠΑ	-	-	-
4	8	Θ	IVS2-13A/C/p.M283V	54.5	>60.5	ΠΑ	-	2.34	5.6
5	7	Θ	p.V281L/p.Q318stop	>60.5	>60.5	ΠΑ	2.92	5.89	-
6	20	Θ	p.V281L/p.Q318stop	>60.5	>60.5	PCOS	5.06	7.76	5
7	26	Θ	p.V281L/p.Q318stop	9.3	>60.5	PCOS	3.17	6.68	
8	32	Θ	p.V281L/Large lesion	>60.5	>60.5	PCOS	3.39	6.45	10

ΠΑ = Πρώιμη Αδρεναρχή, PCOS = Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών

Πίνακας 6. Βιοχημικά ευρήματα σε παιδιά και έφηβες ανάλογα με τον γονότυπο

Μετάλλαξη Ορμόνη	Κορίτσια			Έφηβες και γυναίκες		
	ήπια/ήπια	ήπια/σοβαρή	P τιμή	ήπια/ήπια	ήπια/σοβαρή	P τιμή
Τεστοστερόνη nmol/l	μεσ. 1.64	μεσ. 5.55	0.01	μεσ. 2.64	μεσ. 3.87	0.068
	SD ±1.30	SD ±3.55		SD ±0.94	SD ±0.30	
	n=10	n=3		n=12	n=3	
Δ4 ng/ml	μεσ. 1.86	μεσ. 7.85	0.0006	μεσ. 4.9	μεσ. 7.5	0.15
	SD ±1.00	SD ±3.6		SD ±1.96	SD ±0.15	
	n=9	n=3		n=10	n=2	

Πίνακας 7. Συχέτιση γονότυπου – φαινότυπου

Ομάδα	Γονότυπος	Αριθμός ασθενών	Φαινότυπος		
			SW	SV	NC
Null	p.Phe306insT+p.Val281Leu/ p.Phe306insT+p.Val281Leu	1	1		
	Large deletion / Large deletion	1	1		
	Large deletion /p.Qln318stop	1	1		
A	IVS2-13A/C / IVS2-13A/C	5	4	1	
	IVS2-13A/C / Large deletion	1	1		
B	p.Ile172Asn/p.Ile172Asn	1		1	
C	p.Val281Leu/p.Val281Leu	17			17
	p.Val281Leu/p.Pro453Ser	5			5
	p.Val281Leu/p.Val304Met	3			3
	p.Val281Leu/p.Qln318stop	3			3
	p.Val281Leu/p.Pro482Ser	2			2
	p.Val281Leu/ IVS2-13A/C	1			1
	p.Val281Leu/Large deletion	1			1
	p.Val281Leu/ p.Pro30Leu	1			1
	p.Pro30Leu/IVS2-13A/C	1			1
	p.Val281Leu/p.Met283Val	1			1
	IVS2-13A/C/p.Met283Val	1			1
	p.Pro30Leu+IVS2-13A/C/p.Ile172Asn	1			1
	Σύνολο		47	8	2

Πίνακας 8. Συχνότητα μεταλλάξεων παθολογικών αλληλίων σε 66 μη συσχετιζόμενες θήλεις με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας

CYP21A2 μεταλλάξεις	Αριθμός αλληλίων	% των αλληλίων
	Σύνολο 66	Σύνολο 100
p.Val281Leu	35	53.0
p.Qln318stop	12	18.2
p.Pro482Ser	7	10.6
p.Val304Met	4	6.1
p.Pro453Ser	4	6.1
p.Ala391Thr	1	1.5
απαλείψεις/μετατροπές exons 1-4	1	1.5
απαλείψεις/μετατροπές exons 6-8	1	1.5
μεγάλες απαλείψεις	1	1.5

Πίνακας 9. Απλότυποι αλληλίων με τους πολυμορφισμούς, οι οποίοι αναγνωρίστηκαν στο 3'UTR του γονιδίου CYP21A2

Α. Υγιείς θήλεις μάρτυρες n=150			Β. Θήλεις με υπερανδρογοναμία χωρίς μετάλλαξη n=90			Γ. Ετεροζυγώτες CYP21A2 n=63		
0	n=62	41.30%	0	n=55	61.10%	0	n=8	12.70%
1	n=12	8%	1	n=1	1.10%	1	n=29 [‡]	46%
2	n=28	18.70%	2	n=16	17.80%	2	n=11	17.50%
3	n=21	14%	3	n=8	8.80%	3	n=0	
4	n=8	5.30%	4	n=1	1.10%	4	n=9 [§]	14.30%
5	n=6	4%	5	n=0		5	n=3	4.80%
6	n=9	6%	6	n=4	4.40%	6	n=3	4.80%
7	n=4	2.70%	7	n=3	3.30%	7	n=0	
8	n=0		8	n=2	2.20%	8	n=0	

0 = Χωρίς πολυμορφισμούς.

1 = *52C>T, 440 C>T, 443 T>C.

2 = *52 C>T

3 = *368 T>C, 390 A>G, 440 C>T, 443 T>C, 464 T>C, 474 C>T

4 = *12 C>T, 52 C>T

5 = *52 C>T, 368 T>C, 390 A>G, 440 C>T, 443 T>C, 464 T>C, 474 C>T

6 = *176 C>T

7 = *13 G>A

8 = *93 G>A, 368 T>C, 390 A>G, 440 C>T, 443 T>C, 464 T>C, 474 C>T, 496 C>T.

[‡]Όλες οι 29 γυναίκες, οι οποίες ήταν ετερόζυγες με την p.V281L είχαν ταυτόχρονα και τον συνδυασμό των πολυμορφισμών *52C>T, 440 C>T, 443 T>C στο 3'UTR

[§]Όλες οι 9 γυναίκες, οι οποίες ήταν ετερόζυγες με την p.Q318stop είχαν ταυτόχρονα και τον συνδυασμό των πολυμορφισμών *12 C>T, 52 C>T στο 3'UTR

Πίνακας10. Κλινικά, βιοχημικά και μοριακά ευρήματα σε άτομα με σπάνιες μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A2*

Άτομο	Ηλικία διάγνωσης (χρόνια)	Γονότυπος	Κλινική εικόνα	17-ΟΗΠ nmol/l Βασική τιμή	17-ΟΗΠ nmol/l 60' μετά από ACTH
1	25	p.Val304Met/p.Val281Leu	Δασυτρυχισμός	>60.5	>60.5
2	28	p.Val304Met/p.Val281Leu	Διαταραχές εμμήνου ρύσεως, υπογονιμότητα	4.5	48.5
3	29	p.Val304Met/p.Val281Leu	PCOS	>60.5	>60.5
4	6.5	p.Val304Met/ X	Πρώιμη αδρεναρχή	8.3	13.7
5	17	p.Val304Met/ X	Διαταραχές εμμήνου ρύσεως,	2.4	9.6
6	17	p.Val304Met/ X	PCOS	5.1	11.8
7	26	p.Val304Met/ X	PCOS	5.6	12.2
8	20	pAla391Thr/ X	Διαταραχές εμμήνου ρύσεως, δασυτρυχισμός	6.1	15.8
9	8	IVS2-13A/C/p.Met283Val	Πρώιμη Αδρεναρχή	54.5	>60.5
10	9	p.Val281Leu/p.Met283Val	Πρώιμη Αδρεναρχή	>60.5	>60.5
11	Νεογνό	p.Phe306insT+ p.Val281Leu/p.Phe306insT +p.Val281Leu	Αμφίβολα γεννητικά όργανα Υπονατρίαμια Υπερκαλιαιμία	>60.5	

Πίνακας 11. Συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε 600 αλληλία στον Ελληνοκυπριακό πληθυσμό.

Γνωστές μεταλλάξεις <i>CYP21A2</i>	Αριθμός μεταλλαγμένων αλληλίων	% μεταλλαγμένων αλληλίων	Αριθμός μεταλλαγμένων αλληλίων σε άρρενες	Αριθμός μεταλλαγμένων αλληλίων σε θήλειες
p.Val281Leu	26	4.33	11 (3.67%)	15 (5.0%)
p.Qln318stop	15	2.50	7 (2.33%)	8 (2.67%)
p.Pro453Ser	8	1.33	6 (2.0%)	2 (0.67%)
p.Val304Met	5	0.83	4 (1.33%)	1 (0.33%)
p.Pro482Ser	4	0.67	3 (3.0%)	1 (0.33%)
p.Met283Val	1	0.17	1 (0.33%)	0 (0.00)
Total	59	9.83	32 (5.33%)	27 (4.5%)

Πίνακας 12. Συχνότητα σοβαρών μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε 600 αθήλια στον Ελληνοκυπριακό πληθυσμό.

Σοβαρές μεταλλάξεις <i>CYP21A2</i>	Αριθμός ασθενών με σοβαρές μεταλλάξεις <i>CYP21A2</i> : Ελεγμένοι, (n θετικοί για μετάλλαξη, %)	Αριθμός ατόμων χωρίς σοβαρές μεταλλάξεις <i>CYP21A2</i> : Ελεγμένοι (n θετικοί για μετάλλαξη, %)	Σημειακή εκτίμηση της επίπτωσης των σοβαρών μεταλλάξεων <i>CYP21A2</i> στον Κυπριακό πληθυσμό (95% exact CI)
p.Pro30Leu	11 (1, 9.1)	300 (0, 0.0)	0.0 (0.0, 1.22)
p.F306insT+p.Val281Leu	11 (1, 9.1)	300 (0, 0.0)	0.0 (0.0, 1.22)
p.Ile172Asn	11 (1, 9.1)	300 (0, 0.0)	0.0 (0.0, 1.22)
Large lesion	11 (3, 27.3)	300 (0, 0.0)	0.0 (0.0, 1.22)
IVS2-13A/C>G (c.655A/C>G)	11 (6, 54.6)	300 (0, 0.0)	0.0 (0.0, 1.22)

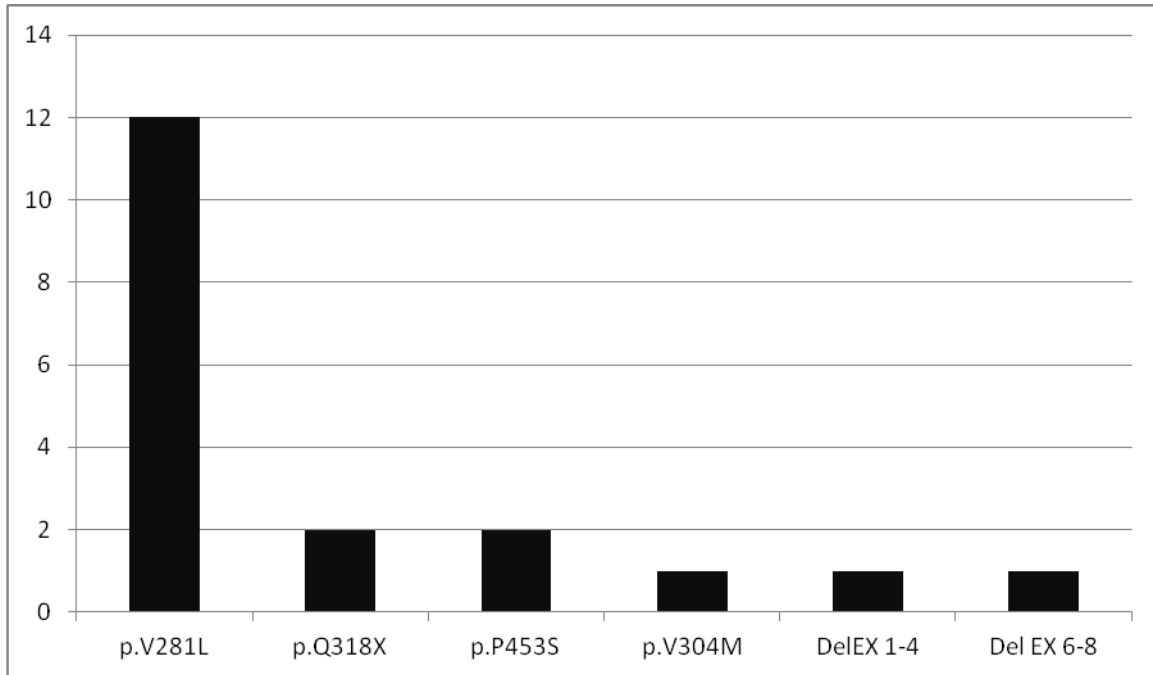
Gene	Chr pos.	lnqth (t)	MV36	ended Order					
					CONTROL	het 8bpdel	hom 8bpdel	het 1172N	V281L + deletion
C4A probe 4802-L4177	06p21.3	178	06-032.1 C4A	1	0.98	1.98	0.95	0.98	2.11
CYP21A1P probe 4805-L4180	06p21.3	265	06-032.1 CYP21A1P exon 01	2	0.89	1.72	1.63	0.91	2.09
CYP21A1P probe 4806-L4181	06p21.3	382	06-032.1 CYP21A1P exon 02	3	1	1.2	1.6	1.01	1.6
CYP21A1P probe 4807-L4182	06p21.3	355	06-032.1 CYP21A2 exon 10	4	1.03	0.72	1.02	1.06	1.02
C4B probe 2357-L2586	06p21.3	154	06-032.1 C4B	5	1.09	1.17	0.89	1.09	1.09
CYP21A2 probe 4804-L4179	06p21.3	202	06-032.1 CYP21A2 exon 01	6	1	1.03	1.05	1	0.6
CYP21A2 probe 1974-L1507	06p21.3	172	06-032.1 CYP21A2 exon 03	7	1.12	0.22	0	1.1	0.68
CYP21A2 probe 1975-L1508	06p21.3	211	06-032.1 CYP21A2 exon 04	8	1.05	0.96	1.01	0.3	0.51
CYP21A2 probe 1976-L1509	06p21.3	229	06-032.1 CYP21A2 exon 06	9	0.88	0.98	0.99	0.88	0.47
CYP21A2 probe 5477-L4895	06p21.3	283	06-032.1 CYP21A2 exon 08	10	0.87	0.77	1.3	0.87	0.57
TNXB probe 1982-L1515	06p21.3	292	06-032.2 TNXB exon 32	11	0.87	1.26	0.84	0.87	1.19
TNXB probe 3033-L2588	06p21.3	310	06-032.2 TNXB exon 15	12	1.12	1.15	0.88	1.12	1.26
TNXB probe 1980-L1513	06p21.3	319	06-032.2 TNXB exon 01	13	1.23	1.01	1.18	1.23	1.15
CREBL1 probe 1979-L1512	06p21.3	337	06-032.2 CREBL1	14	1.13	1.08	0.93	1.13	1.05
Reference probe 1918-L1462	01q21	328	c	15	0.99	0.94	1.03	0.99	0.97
Reference probe 1252-L0902	02p16	364	c	16	1	1.13	0.86	1	1.12
Reference probe 5266-L4649	02p22.3	160	c	17	1.14	0.77	0.95	1.14	0.82
Reference probe 0797-L0463	05q31	130	c	18	0.91	0.91	1	0.91	0.97
Reference probe 0662-L0158	06p21.3	136	c	19	0.76	0.72	1.02	0.76	0.77
Reference probe 1994-L0363	06p21.3	346	c	20	1.09	1.07	1.02	1.09	1.02
Reference probe 2184-L1682	06q26	391	c	21	1.06	1.06	1.03	1.06	0.98
Reference probe 4362-L3782	07p	373	c	22	1.1	1.09	0.96	1.1	1.04
Reference probe 5038-L4424	09p13	220	c	23	0.96	0.97	0.96	0.96	0.96
Reference probe 0486-L0083	11p13	193	c	24	0.99	0.98	1.09	0.99	1.01
Reference probe 0594-L0011	11q13	148	c	25	1.19	1.29	0.86	1.19	1.15
Reference probe 1604-L1186	13p	247	c	26	1	1	1.01	1	0.98
Reference probe 2469-L1913	15q21	256	c	27	1	0.98	1.11	1	1
Reference probe 2516-L1947	17q29	184	c	28	0.99	0.97	1.24	0.99	1
Reference probe 2319-L1810	19p13	274	c	29	1.08	1.05	0.92	1.08	0.98
Reference probe 4199-L3535	20q13	142	c	30	1.2	1.18	0.97	1.2	1.14
Reference probe 1575-L1147	22q12.	301	c	31	1.13	1.19	0.86	1.13	1.17
Reference probe 1565-L1137	22q26	166	c	32	1	1	0.94	1	1.05

Σχήμα 1α. MLPA - Multiple Ligation-dependent Probe Amplification with SALSA KIT-B2 CAH που ανιχνεύει μεταλλάξεις και μεγάλες απαλείψεις στο γονίδιο της *CYP21A2*.

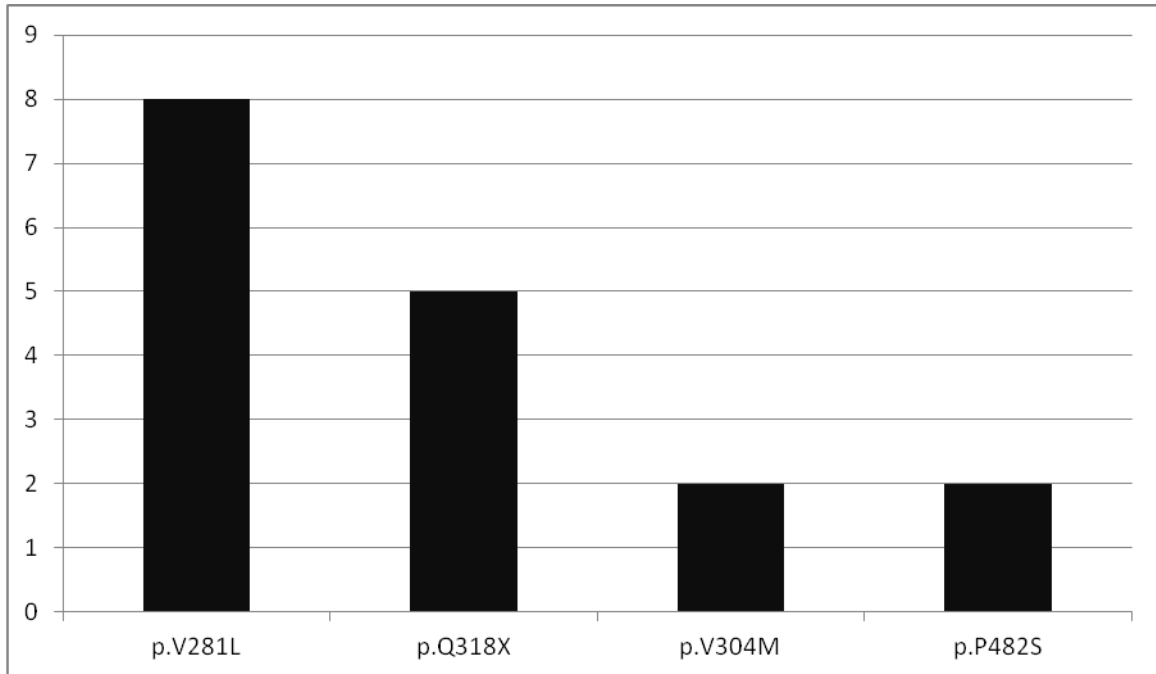
Gene	Chr pos.	Length (bp)	MV36	Intended Order	CONTROL	het 8bpdel	hom 8bpdel	het I172N	V281L + deletion
C4A probe 4802-L4177	06p21.3	178	06-032.1 C4A	1	0.98	1.98	0.95	0.98	2.11
CYP21A1P probe 4805-L4180	06p21.3	265	06-032.1 CYP21A1P exon 01	2	0.89	1.72	1.63	0.91	2.09
CYP21A1P probe 4806-L4181	06p21.3	382	06-032.1 CYP21A1P exon 02	3	1	1.2	1.6	1.01	1.6
CYP21A1P probe 4807-L4182	06p21.3	355	06-032.1 CYP21A2 exon 10	4	1.03	0.72	1.02	1.08	1.02
C4B probe 2357-L2586	06p21.3	154	06-032.1 C4B	5	1.09	1.17	0.89	1.09	1.09
			2 exon 01	6	1	1.03	1.05	1	0.6
			2 exon 03	7	1.12	0.22	0	1.1	0.68
			2 exon 04	8	1.05	0.96	1.01	0.3	0.51
			2 exon 06	9	0.88	0.98	0.99	0.88	0.47
			2 exon 08	10	0.87	0.77	1.3	0.87	0.57
TMYR probe 1082-L1515	06p21.3	202	06-032.1 TMYR exon 22	11	0.87	1.28	0.84	0.87	1.18

Ανιχνευτές που καλύπτουν συγκεκριμένες περιοχές του CYP21A2

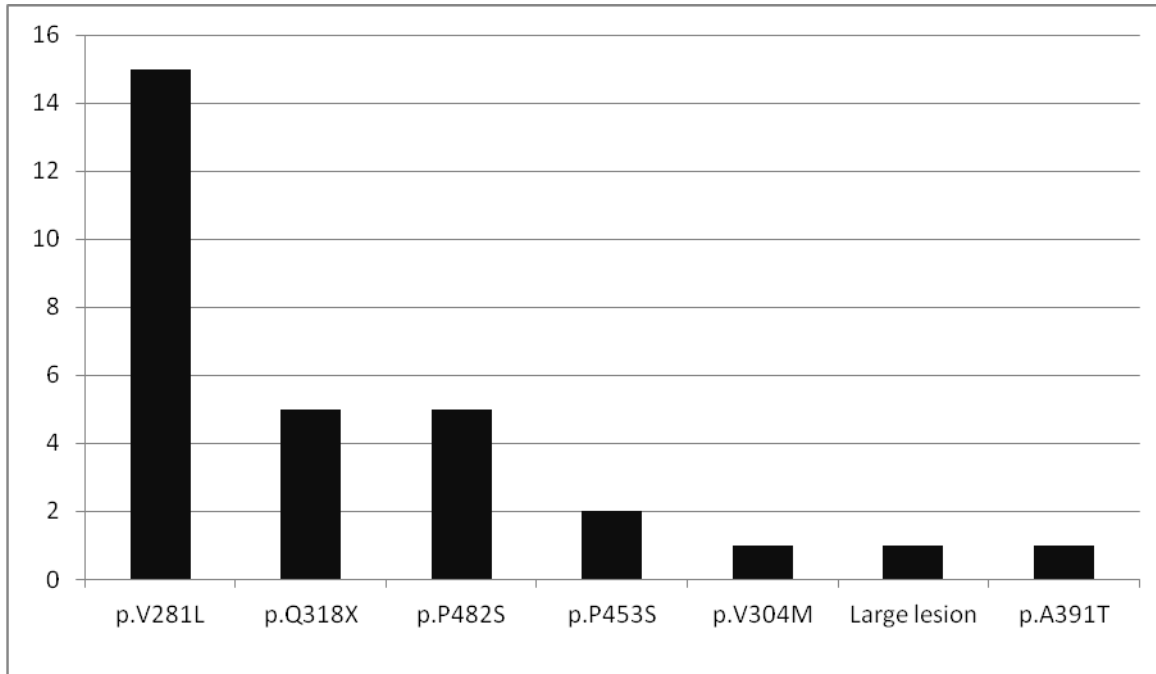
Σχήμα 1β. MLPA - Multiple Ligation-dependent Probe Amplification with SALSA KIT-B2 CAH που ανιχνεύει την απάλειψη 8bpdel, την p.Ile172Asn και μεγάλη απάλειψη στο γονίδιο της CYP21A2. Οι αριθμοί δίνονται από το λογισμικό και αντιστοιχούν στο ποσό των primer probes που ανιχνεύονται. Με μπλε είναι τα φυσιολογικά όρια, με κόκκινο η πιθανή μετάλλαξη ή απάλειψη και με πράσινο είναι περισσότερα από ένα αντίγραφα.



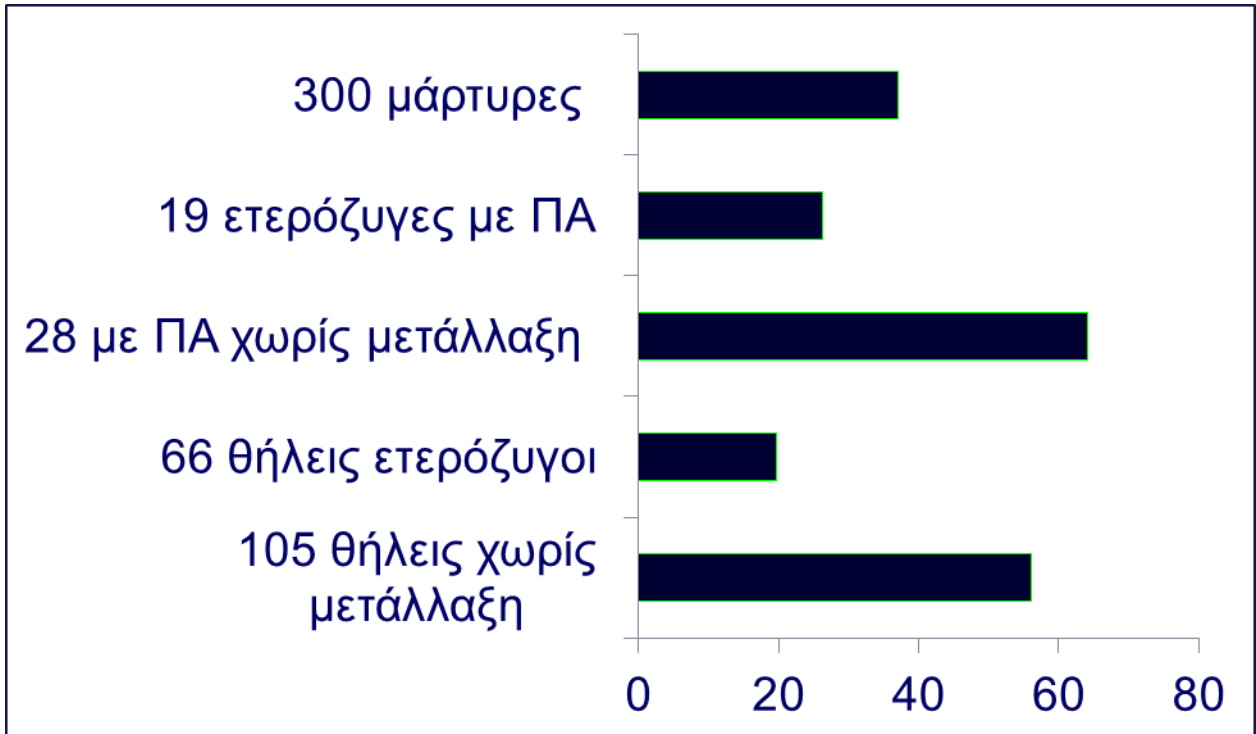
Σχήμα 2. Συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε 19 κορίτσια με Πρώιμη Αδρεναρχή, που έφεραν ένα παθολογικό αλληλίο



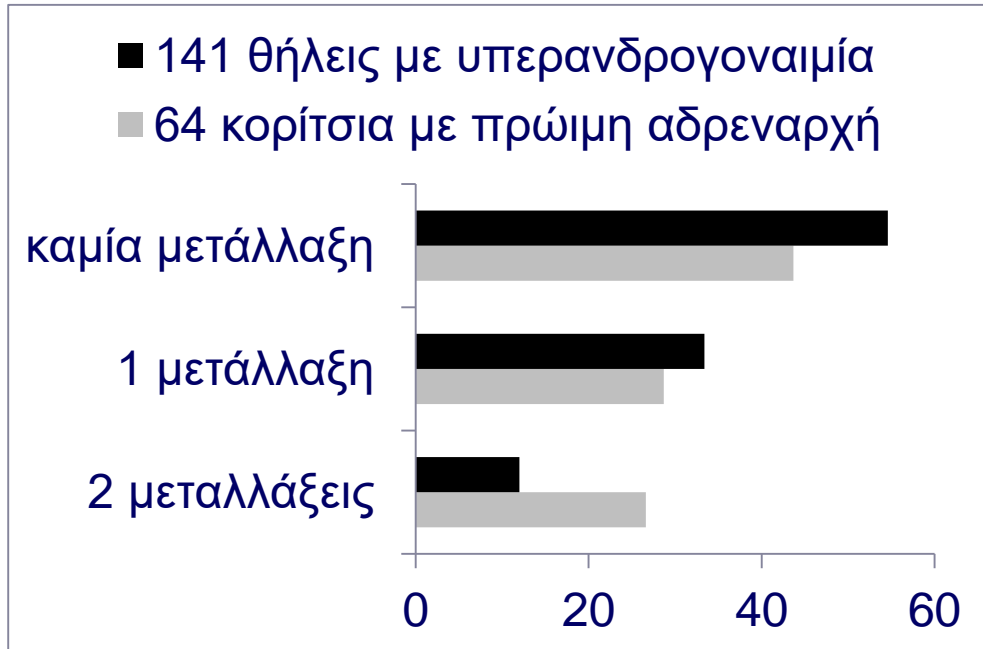
Σχήμα 3. Συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε 17 έφηβες με υπερανδρογοναιμία, που έφεραν ένα παθολογικό αλληλίο



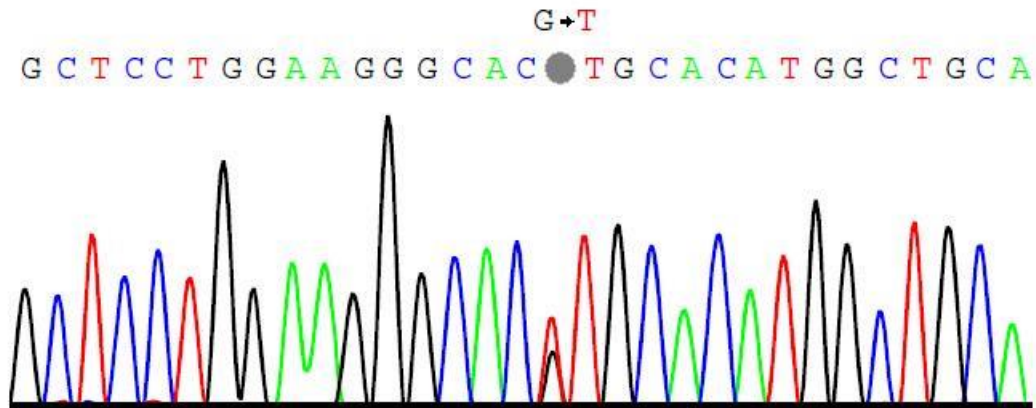
Σχήμα 4. Συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου CYP21A2 σε 30 Γυναίκες με υπερανδρογοναιμία, που έφεραν ένα παθολογικό αλληλίο



Σχήμα 5. Εκατοστιαία συχνότητα του πολυμορφισμού p.N493S, σε μάρτυρες, κορίτσια με πρώιμη αδρεναρχή (ΠΑ) και θήλεις, ετερόζυγες και χωρίς καμία μετάλλαξη.



Σχήμα 6. Εκατοστιαία συχνότητα αναγνώρισης μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* σε κορίτσια με πρώιμη αδρεναρχή και εφηβες και γυναίκες με κλινική υπερανδρογοναιμία.



Σχήμα 7. Ελεκτροφερόγραμμα αυτόματης αλληλούχισης που απεικονίζει τη μετάλλαξη p.Val281Leu σε ετεροζυγία στο εξώνιο 7 του γονιδίου *CYP21A2*

3. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη περιγράφεται το φάσμα και η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλίων *CYP21A2*, σε μη συσχετιζόμενους Ελληνοκυπρίους ασθενείς με ΣΥΕ οφειλόμενη σε έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης. Επίσης ερευνάται η σχέση γονότυπου – φαινότυπου, η κλινική σημασία της παρουσίας ενός παθολογικού αλληλίου και εκτιμάται η συχνότητα των μεταλλαγμένων *CYP21A2* αλληλίων στο γενικό πληθυσμό της Κύπρου, ο οποίος είναι κυρίως Ελληνικής προέλευσης με προσμίξεις όμως γειτονικών λαών.

Η ΣΥΕ αποτελεί μία ομάδα διαταραχών, οι οποίες κληρονομούνται με αυτόσωμο υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζονται από ελλειμματική βιοσύνθεση της Κορτιζόλης, λόγω έλλειψης ενός εκ των ενζύμων, τα οποία απαιτούνται για την βιοσύνθεση της στον φλοιό των επινεφριδίων. Η συχνότερη μορφή της ΣΥΕ (95% των περιπτώσεων) οφείλεται σε έλλειψη της 21-Υδροξυλάσης, ως αποτέλεσμα γενετικών λαθών στο γονίδιο *CYP21A2*, με καθολικά υπολογιζόμενη συχνότητα 1:10,000 με 1:15,000 γεννήσεις (98, 123, 192-197).

Το γονίδιο *CYP21A2* εδράζεται στο βραχύ σκέλος του χρωμοσώματος 6, στην περιοχή του συστήματος μείζονος ιστοσυμβατότητας MHC, σε απόσταση 30 kb από το ομόλογο (>95%) ψευδογονίδιο *CYP21A1P*. Η θέση αυτή του γονιδίου *CYP21A2* το καθιστά ευάλωτο σε γενετικούς ανασυνδυασμούς με το ομόλογο *CYP21A1P*. Η γειπνίαση αυτών των γονιδίων και η τοποθεσία τους στη περιοχή MHC, η οποία κωδικοποιεί την σύνθεση των HLA και στην οποία παρατηρούνται συχνά ανασυνδυασμοί διευκολύνει αυτά τα γενετικά φαινόμενα (95, 96, 123).

Τα γενετικά λάθη του γονιδίου *CYP21A2* προέρχονται από δύο τύπους ανασυνδυασμών ανάμεσα στο *CYP21A2* και στο *CYP21A1P* ψευδογονίδιο: άνισες διασταυρώσεις κατά τη διάρκεια της μείωσης, οι οποίες οδηγούν σε απαλείψεις *CYP21A2* και μετατροπές, με αποτέλεσμα την μεταφορά αλλοιωμένων αλληλουχιών από το *CYP21A1P* στο *CYP21A2*, όπου καθίστανται επιζήμιες (142).

Τα γενετικά λάθη του γονιδίου *CYP21A2* ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον βαθμό της ενζυματικής λειτουργίας και τυπικά ανταποκρίνονται στις τρεις κλινικά μορφές της έλλειψης της 21- Υδροξυλάσης: με απώλεια άλατος (SW), απλή αρρενοποιητική (SV), και όψιμης εκδήλωσης/ μη κλασσική (NC) ΣΥΕ. Μελέτες *in vitro* έχουν αποδείξει ότι μεταλλάξεις που οδηγούν σε πλήρη απουσία της δραστηριότητας του ενζύμου 21- Υδροξυλάση συνάδουν με τον φαινότυπο SW, αυτές που μειώνουν την ενζυματική δραστηριότητα περίπου κατά 2% συνάδουν με τον SV φαινότυπο, ενώ αυτές που μειώνουν την δραστηριότητα στο 10% με 75% συμβαδίζουν με τον φαινότυπο της NC μορφής. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται συμφωνία μεταξύ γονότυπου και φαινότυπου, αν και δεν είναι πάντα εφικτό να γίνει επακριβώς η πρόβλεψη της κλινικής έκφρασης βάσει της υποκείμενης γενετικής διαταραχής (198). Οι περισσότεροι ασθενείς ανευρίσκονται να είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες, όπου η σοβαρότητα της νόσου καθορίζεται από την δραστηριότητα του λιγότερο επηρεαζόμενου αλληλίου (130, 199, 200).

Το γονίδιο *CYP21A2* αποτελεί ένα από τα πλέον πολυμορφικά γονίδια, όπου περισσότερα από 100 αλληλία έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με ΣΥΕ (Human

Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Η συχνότητα των γενετικών λαθών της 21-Υδροξυλάσης έχει εκτεταμένα μελετηθεί και έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει εθνικά ειδική κατανομή των μεταλλάξεων όπως φαίνεται στον πίνακα Α (201). Μελέτες σε γειτονικές με τη Κύπρο χώρες στη περιοχή της Μεσογείου αναφέρουν τις ακόλουθες μεταλλάξεις: IVS2-13A/C, p.Qln318stop, p.Val281Leu, μεγάλες απαλείψεις ως τις πιο συχνές γενετικές βλάβες (202-206).

Η κλασική μορφή της ΣΥΕ φαίνεται να είναι σπάνια στη Κύπρο, αφού παρατηρήθηκαν μόνο 10 νεοδιαγνωσθέντα περιστατικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 χρόνων 1979 – 2008. Με δεδομένο τον συνολικό αριθμό των ζώντων γεννήσεων κατά τη περίοδο αυτή, που ανέρχονται σε 309,470, (www.mof.gov.cy), η συχνότητα της κλασικής μορφής ΣΥΕ υπολογίζεται σε 1:30,000, πολύ χαμηλότερη από την αναμενόμενη 11:10,000- 15,000 (192, 194, 196, 197). Επιπλέον η υπερίσχυση των αρρένων ασθενών στο δείγμα μας αντικρούει την άποψη ότι πιθανόν άρρενα πάσχοντα νεογνά με τη μορφή με απώλεια άλατος να έχουν καταλήξει και να έχουν διαφύγει από τη διάγνωση (207). Σε πρόσφατη ωστόσο μελέτη βασισμένη σε δημογραφικά δεδομένα μεταξύ 1910 και 2011 στη Σουηδία, η οποία θεωρείται αναπτυγμένη χώρα υποστηρίχθηκε ότι η η σχέση θήλυ/άρρενα στη διαφυγή από τη διάγνωση ήταν ίση, παρά την υπερίσχυση της κλινικής προβολής στα θήλεα έτσι που να υποστηρίζεται ότι η εισαγωγή των ανιχνευτικών προγραμμάτων για έγκαιρη διάγνωση της ΣΥΕ είναι επιβεβλημένη για την έγκαιρη διάγνωση (208).

Πίνακας Α. Συχνότητα μεταλλάξεων (%) του γονιδίου *CYP21A2* σε διάφορες μελέτες

Μετάλλαξη Αλληλίου	Παρούσα Μελέτη	Dracopoulou et al. (202)	New et al. (209)	Marino et al. (210)	Wedell et al. (130)	Stikkelbroeck et al. (211)	Krone et al. (212)
Deletion και large gene conversions	5.3	13.5	20.0	11.2	32.2	31.9	29.0
p.Pro30Leu	2.1	11.3	2.6	0.7	1.6	0.3	2.6
IVS2-13A/C	14.9	29.3	22.9	20.6	26.6	28.1	30.3
8bpdelE3		2.25	2.1	0.8	1.1	4.3	1.6
p.Ile172Asn	3.2	13.5	8.2	8.2	19.8	12.4	19.7
p.Val281Leu	54.8	10.8	23.9	26.2	5.7	2.2	2.9
p.Qln318stop	4.2	8.6	3.5	6.7	2.4	3.5	4.8
Εθνικότητα	Ελληνο-κύπριοι	Έλληνες	Ετερογενής	Αργεντινοί	Σουηδοί	Ολλανδοί	Γερμανοί

Τα πιο συχνά ανευρεθέντα μοριακά λάθη στην μορφή με απώλεια άλατος ήταν η μετάλλαξη ομόφωνης ακολουθίας ματίσματος IVS2-13A/C>G και μεγάλες απαλείψεις. Η υψηλή συχνότητα της IVS2-13A/C έχει παρατηρηθεί και στις πλείστες μέχρι τώρα μελέτες (21, 127, 128, 134, 135, 137, 198, 202, 212-218).

Η μετάλλαξη p.Qln318stop αναγνωρίστηκε σε ένα μόνο ασθενή, σύνθετο ετεροζυγώτη ως μεγάλη απάλειψη/p.Qln318stop. Η παρατηρηθείσα αυτή χαμηλή συχνότητα διαφέρει από την ανευρεθείσα στον Ελληνικό πληθυσμό, η οποία ανέρχεται σε 14.3% και σε άλλες εθνικές ομάδες και δυνατόν να ερμηνεύεται με τη διαφορά στο γενετικό υπόστρωμα ή στον μικρό αριθμό ασθενών που παρατηρείται στη Κύπρο (128, 134, 135, 202),

Παρομοίως η μετάλλαξη p.Ile172Asn, η οποία ανευρίσκεται σε ποσοστό 13.5% στους Έλληνες ασθενείς αναγνωρίστηκε σε ένα μόνο παιδί με την αναμενόμενη απλή αρρενοποιητική μορφή. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη παρατηρείται σε ποσοστό 4% σε ασθενείς στη Τουρκία, σε 30% στο Μαρόκο και σε κανένα ασθενή στη Σικελία (204-206).

Η δεσπόζουσα γενετική διαταραχή στην μη κλασσική μορφή είναι η μετάλλαξη p.Val281Leu, όπως παρατηρείται σε όλους σχεδόν τους πληθυσμούς που έχουν μελετηθεί (21, 127, 128, 131, 202, 213, 217). Η συνολική όμως συχνότητα αυτής της μετάλλαξης είναι από τις υψηλότερες που έχουν παρατηρηθεί τόσο στον Ελληνικό και Ευρωπαϊκό χώρο όσο και στην ευρύτερη περιοχή της Μεσογείου (126, 136, 202-206, 212, 213, 219-221). Η μετάλλαξη αυτή κυριαρχεί στο δικό μας πληθυσμό αφού έχει εντοπιστεί σε 4.3 % στους υγιείς μάρτυρες (222).

Η φαινοτυπική έκφραση της έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης εξαρτάται πρωταρχικά από τον τύπο της μοριακής διαταραχής και συνάδει με το λιγότερο επηρεαζόμενο αλληλίο αν και δεν αντικατοπτρίζει πάντα το υποκείμενο γενετικό λάθος (202). Χρησιμοποιώντας μοντέλο ηλεκτρονικού υπολογιστή για την ανεύρεση συσχέτισης της σοβαρότητας της νόσου με 113 γνωστές μεταλλάξεις στη βάση του βαθμού της ενζυμικής διαταραχής *in silico* βρέθηκε ότι μεταλλάξεις που επηρεάζουν ουσιώδη λειτουργικά μέρη του ενζύμου όπως αγκυροβόληση της μεμβράνης, δέσμευση με το υπόστρωμα ή μεταβάλλουν τη σταθερότητα του οδηγούν σε πλήρη απώλεια της λειτουργικότητας με τελικό αποτέλεσμα τη μορφή με απώλεια άλατος (223). Αντιθέτως μεταλλάξεις που επηρεάζουν το διαμεμβρανικό μέρος οδηγούν σε 98% μείωση της δραστηριότητας με συνέπεια την κλινική έκφραση με την απλή αρρενοποιητική μορφή. Ηπια μη κλασσική μορφή προέρχεται από όχι τόσο ζωτικής σημασίας διαταραχή όπως παρέμβαση στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και δέσμευση με υδρογόνο .

Η πλέον σημαντική βιβλιογραφικά συσχέτιση γονότυπου φαινότυπου επί συνόλου 1,507 οικογενειών κατέδειξε ότι η σχέση δεν ήταν απόλυτη και μεταλλάξεις όπως p.Pro30Leu, IVS2-13A/C, και p.Ile172Asn οδηγούν σε διαφορετικούς φαινότυπους. Συγκεκριμένα η IVS2-13A/C δύναται να εκδηλωθεί ως απλή αρρενοποιητική μορφή ίσως λόγω διαφυγής της δράσης της σε μικρό αριθμό μεταγραφών οι οποίες παραμένουν λειτουργικές, η p.Ile172Asn αναγνωρίζεται σε σημαντικό αριθμό ασθενών με την μορφή με απώλεια άλατος και τέλος η αμφιλεγόμενη p.Pro30Leu παρουσιάζεται σε ασθενείς με τη κλασσική μορφή (209).

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε μια σχεδόν πλήρης ταύτιση της σχέσης γονότυπου – φαινότυπου. Όλοι οι ασθενείς, οι οποίοι ανήκαν στην ομάδα null και A είχαν την κλασσική μορφή όπως ήταν αναμενόμενο ενώ υπήρχε ένα μόνο παιδί στην ομάδα B, που είχε την απλή αρρενοποιητική μορφή. Όλοι οι ασθενείς της ομάδας C εκδήλωσαν την μη κλασσική μορφή, με κάποια όμως διαφοροποίηση στο κορίτσι που έφερε τη μετάλλαξη p.Pro30Leu συνδυαζόμενη με την IVS2-13A/C και σε ομοζυγωτία τον πολυμορφισμό p.Asn493Ser. Συγκεκριμένα το παιδί αυτό εκδήλωσε σοβαρή μορφή της μη κλασσικής μορφής με πρώιμη αδρεναρχή στην ηλικία των 4 χρόνων και κλειτορομεγαλία με προχωρημένη κατά 6 χρόνια οστική ηλικία και υψηλές τιμές επινεφριδιακών ανδρογόνων με οριακά αυξημένα επίπεδα ACTH. Η επίδραση του πολυμορφισμού p.Asn493Ser στην ενζυμική δραστηριότητα της 21 – Υδροξυλάσης δεν έχει μέχρι τώρα ερευνηθεί *in vitro*, όμως μία πρόσφατη μελέτη μοριακού μοντέλου του ανθρώπινου CYP21A2 έδειξε ότι η μη διατηρημένη αλλαγή του αμινοξέος δεν αλλάζει το ηλεκτροστατικό φορτίο (224).

Η αμφιλεγόμενη παρανοηματική μετάλλαξη p.Pro30Leu αναγνωρίστηκε επίσης σε άλλα δύο κοριτσάκια σε σύνθετη ετεροζυγωτία με τη p.Val281Leu και στον μη συνήθη απλότυπο p.Pro30Leu+IVS2-13A/C/p.Ile172Asn αντίστοιχα. Και στις περιπτώσεις αυτές η κλινική εκδήλωση της μη κλασσικής μορφής φαίνεται να είναι σοβαρή με ενωρίς εκδήλωση πρώιμης αδρεναρχής με ήπια αρρενοποίηση, αυξημένα επίπεδα ανδρογόνων και επιτάχυνση της οστικής ηλικίας. Αν και η *in vitro* έκφραση της εναπομένουσας δραστηριότητας της 21 – Υδροξυλάσης στο ένζυμο που φέρει τη μετάλλαξη p.Pro30Leu είναι στα ίδια περίπου επίπεδα με το

μεταλλαγμένο με την ήπια p.Val281Leu, φαίνεται ότι αυτό δεν μεταφράζεται με ανάλογη δραστικότητα *in vivo* (204).

Η γενικώς ήπια θεωρούμενη παρανοηματική μετάλλαξη p.Pro30Leu, αν και είναι γνωστό ότι διατηρεί την ενζυμική δραστηριότητα και γενικώς συνδυάζεται με την μη κλασσική μορφή, συχνά ανευρίσκεται σε ασθενείς με έκδηλη υπερανδρογοναιμία (145, 198, 225). Στον Ελληνικό πληθυσμό η μετάλλαξη p.Pro30Leu αναγνωρίστηκε σε 1 τουλάχιστον από τα 2 χρωμοσώματα σε 5 από 6 γονοτύπους της μη κλασσικής μορφής που είχαν φαινότυπο απλής αρρενοποιητικής μορφής (202). Παρόμοια ευρήματα παρατηρούνται και στη μελέτη των Krone *et al.* (212), όπου η πρόβλεψη για τους ασθενείς της ομάδας C ήταν ισχυρότερη όταν αποκλειόταν από την στατιστική ανάλυση η συγκεκριμένη μετάλλαξη. Η παρουσία της p.Pro30Leu βρέθηκε σε 23 από τους 93 ασθενείς με την απλή αρρενοποιητική μορφή είτε σαν ομοζυγωτία είτε σαν σύνθετη ετεροζυγωτία με άλλη μετάλλαξη ή μεγάλη απάλειψη/μετατροπή (213). Η ποικιλομορφία του κλινικού φαινότυπου στους ασθενείς που φέρουν τη μετάλλαξη p.Pro30Leu ενισχύεται ακόμα από το γεγονός ότι παρατηρείται σε όλες τις μορφές της ΣΥΕ (220).

Στην παρούσα μελέτη επίσης περιγράφεται εκτός από το φάσμα και τη συχνότητα των αλληλίων *CYP21A2* και η σχέση γονότυπου – φαινότυπου στους ασθενείς που είχαν τη μη κλασσική μορφή ΣΥΕ. Η συχνότητα της μορφής αυτής σε γυναίκες με υπερανδρογοναιμία ποικίλλει στις δημοσιευμένες μελέτες από 1.2% μέχρι 10% αντανακλώντας τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στους πληθυσμούς καθώς και τις διαφωνίες στα διαγνωστικά κριτήρια (78, 226-229).

Σε μία πρόσφατη μελέτη όπου η δοκιμασία ACTH διενεργήθηκε συστηματικά σε γυναίκες με δασυτρυχισμό η διάγνωση της μη κλασσικής μορφής παρέμεινε σταθερά στο ποσοστό των 6% όλων των περιστατικών (228).

Η κλινική έκφραση του γονότυπου της μη κλασσικής μορφής ποικίλλει ακόμα και ανάμεσα σε άτομα στην ίδια οικογένεια που φέρουν πανομοιότυπη μετάλλαξη, έτσι που να φαίνεται ότι επιπρόσθετοι παράγοντες τροποποιούν τον φαινότυπο της πάθησης (229). Η κλινική έκφραση της ΣΥΕ εξαρτάται από την ηλικία, από το ρυθμό μεταβολισμού των στεροειδών, από τη διαφορά στη παραγωγή ανδρογόνων και ακόμα καθορίζεται από τη διαφορετικότητα στην ευαισθησία στα ανδρογόνα και την ανταπόκριση του δέρματος και πιθανόν από τη παρουσία άλλων γονιδίων (modified genes) που τροποποιούν τη δραστικότητα της 21 Υδροξυλάσης (229). Σε οικογενειακές μελέτες είναι εμφανές ότι η μη κλασσική μορφή ενδέχεται να παραμένει ασυμπτωματική σε θήλεις που αναγνωρίζονται υποχρεωτικά ομοζυγώτες με δυο παθολογικά αλληλία, οι οποίες ποτέ δεν εμφάνισαν υπερανδρογοναιμία ούτε και αναζήτησαν ιατρική συμβουλή (78, 229). Παρόμοια περιστατικά εντοπίστηκαν και στη παρούσα εργασία με την εκτενή μελέτη των οικογενειακών δέντρων.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η συσχέτιση των μοριακών και βιοχημικών ευρημάτων στους ασθενείς με μη κλασσική μορφή και πλήρως αναγνωρισθέντα γονότυπο. Τα επίπεδα της βασικής τιμής της 17-ΟΗΠ ήταν μεγαλύτερα του εργαστηριακού ορίου των 60.5 nmol/l σε 75% των ασθενών που έφεραν συνδυασμό ήπιας/σοβαρής μετάλλαξης σε αντιδιαστολή με 37.9% των ασθενών που έφεραν ήπια/ήπια μετάλλαξη. Είναι γνωστό ότι η μέση τιμή βασικής

και μετά από διέγερση με ACTH 17-ΟΗΠ καθώς και τα επίπεδα της Τεστοστερόνης και Ανδροστενεδιόνης βρίσκονται σημαντικά υψηλότερα στους ασθενείς που φέρουν γονότυπο με συνδυασμό ήπιας/σοβαρής μετάλλαξης (229, 230). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Ezquieta *et al*, όπου ο βαθμός της ενζυμικής έλλειψης, έτσι τουλάχιστον όπως εκτιμήθηκε με τον προσδιορισμό της βασικής και μετά από διέγερση με ACTH τιμή της 17-ΟΗΠ βρέθηκε να είναι μεγαλύτερος στα παιδιά με γονότυπο ήπιας/σοβαρής μετάλλαξης, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στην κλινική έκφραση (231).

Τα παιδιά στη μελέτη ωστόσο που είχαν ήπιο/σοβαρό γονότυπο εκδήλωσαν σχετικά νωρίς συμπτωματολογία αφού 5 στους 8 ασθενείς της ομάδας αυτής παρουσίασαν πρώιμη αδρεναρχή σε αντιδιαστολή με 14 από τους 29 ασθενείς της άλλης ομάδας, όπου το 50 % περίπου είχε κλινική εκδήλωση στην εφηβεία και αργότερα. Η πλειονότητα των ασθενών της τελευταίας ομάδας είχε πλήρως εκδηλώσει τη τυπική συμπτωματολογία του PCOS ενώ δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση μεταξύ του υποκείμενου γονότυπου και των άλλων κλινικών σημείων.

Οι σπάνιες μεταλλάξεις p.Val304Met και p.Met283Val αναγνωρίστηκαν σε σύνθετη ετεροζυγωτία με την p.Val281Leu σε τέσσερις θήλεις και σε ένα άρρενα με ήπια εκδήλωση της μη κλασσικής μορφής. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη p.Val304Met, η οποία παρατηρείται σπανίως είναι ήπια και μετά από έκφραση σε COS-1 κύτταρα, το μεταλλαγμένο ένζυμο βρέθηκε να έχει υπολειπόμενη δραστηριότητα 46% και 26 % για τη μετατροπή της 17-ΟΗΠ και Προγεστερόνης αντίστοιχα συγκριτικά με το φυσιολογικό ένζυμο (232). Τόσο η p.Val304Met όσο και η p.Met283Val παρανοηματικές μεταλλάξεις εδράζονται σε περιοχές οι οποίες

φαίνεται να επηρεάζουν την αλληλοεπίδραση του υποστρώματος στο πρωτεϊνικό μοντέλο (5, 233, 234).

Αριθμός μελετών έχει καταδείξει την υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας σε μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2* σε παιδιά, έφηβες και γυναίκες που κλινικά προβάλλουν με σημεία υπερανδρογοναιμίας όπως πρώιμη αδρεναρχή, σοβαρή ακμή, δασυτρυχισμό, διαταραχές εμμήνου ρύσεως και συνήθως πληρούν τα κριτήρια του PCOS (196, 235-239). Αντίθετα ευρήματα ωστόσο προκύπτουν από πρόσφατη Ελληνική δημοσίευση όπου μόνο το 7.6% των 197 γυναικών με PCOS που μελετήθηκαν ήταν ετεροζυγώτες με μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2*, έτσι που να αμφισβητείται η συμβολή της ετεροζυγωτίας του γονιδίου στην εκδήλωση του PCOS (240).

Οι περισσότερες από τις μελετηθείσες θήλεις (παιδιά, έφηβες και γυναίκες) με κλινική υπερανδρογοναιμία είχαν σημαντική αύξηση της βασικής τιμής της 17-ΟΗΠ στα 60 λεπτά μετά από διέγερση με ACTH, εύρημα συμβατό με πιθανή ετεροζυγωτία για έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης, η οποία και αναγνωρίστηκε με αλληλούχιση του DNA και ανάλυση με MLPA για προσδιορισμό μεταλλάξεων στο γονίδιο *CYP21A2*. Οι πιο συχνά ανευρεθείσες μεταλλάξεις ήταν οι ήπιες p.Val281Leu, p.Pro482Ser, p.Pro453Ser, p.Val304M, p.Ala391Thr και οι σοβαρές p.Qln318stop, μεγάλες απαλείψεις και μετατροπές των εξονίων 1-4 και 6-8 καθώς και η απάλειψη c.707_714delGAGACTAC (8bpdelE3) (241).

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα θήλα άτομα που φέρουν μία παθολογική μετάλλαξη του γονιδίου *CYP21A2* έχουν αυξημένο κίνδυνο να εκδηλώσουν κλινική υπερανδρογοναιμία (22, 221, 229, 235, 242). Υψηλή συχνότητα

ετεροζυγωτίας περιγράφεται σε κορίτσια με πρώιμη αδρεναρχή Γαλλικής καταγωγής, τα οποία είχαν επίσης υψηλότερα του φυσιολογικού επίπεδα 17 – ΟΗΠ (236). Επιπρόσθετα αρκετές μελέτες έχουν περιγράψει άτομα και από τα δύο φύλα με ήπια μορφή της μη κλασσικής μορφής να φέρουν μία μόνο μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* (243-245). Οι ερευνητές Admoni et al. το 2006 πρότειναν μία επικρατούσα – αρνητικά επίδραση του μεταλλαγμένου με p.Val281Leu αλληλίου στον άγριο (wild) τύπο έτσι που να μειώνεται σημαντικά η δραστικότητα του. Το μεταλλαγμένο ένζυμο ενδέχεται να ανταγωνίζεται ή να εμπλέκεται με τη δράση του άγριου τύπου στη μετατροπή της 17 – ΟΗΠ σε 11-δεοξυκορτιζόλη (235). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη p.Val281Leu είναι συχνή στο δικό μας πληθυσμό και δεσπόζει στους συμπτωματικούς φορείς.

Οι φορείς της μετάλλαξης p.Val281Leu είχαν υψηλότερη μέση τιμή 17-ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH συγκριτικά με φορείς άλλων μεταλλάξεων, έτσι που να δικαιολογείται πιο σοβαρή μείωση στη δραστικότητα της 21 – Υδροξυλάσης με συνέπεια την αυξημένη έκθεση στα ανδρογόνα. Το εύρημα αυτό υποστηρίζει την ήδη υπάρχουσα άποψη ότι οι φορείς της ήπιας μετάλλαξης p.Val281Leu έχουν ψηλότερες τιμές ACTH-διεγερμένης 17-ΟΗΠ και παρουσιάζουν σε αυξημένη συχνότητα διαταραχές εμμήνου ρύσεως, δασυτρυχισμό και σύνδρομο PCOS (235, 246). Η αυξημένη παραγωγή 17 – ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH που παρατηρείται σε ετεροζυγώτες *CYP21A2* φορείς πιθανόν να οφείλεται και στη συνέργεια άλλων τροποποιητικών παραγόντων όπως γονιδίων και ορμονών, οι οποίοι εμπλέκονται στην περίσσεια ανδρογόνων και στη κλινική έκφραση της ΣΥΕ (229).

Στην ομάδα των φορέων επίσης αναγνωρίστηκε η σπάνια μετάλλαξη p.Val304Met και οι λιγότερο συχνά περιγραφείσες απαλείψεις των εξονίων del1-4 και del6-8. Η σπάνια p.Val304Met αναγνωρίστηκε σε ένα κορίτσι 7 χρόνων με σημεία πρώιμης αδρεναρχής και σε δύο έφηβες με διαταραχές εμμήνου ρύσεως και σύνδρομο PCOS. Οι μεγάλες απαλείψεις/ μετατροπές των εξονίων 1-4 και 6-8 ανιχνεύθηκαν σε δύο κοριτσάκια με πρώιμη αδρεναρχή. Όπως ήταν αναμενόμενο η κλινική προβολή στην ομάδα των ετεροζυγωτών ήταν η πρώιμη αδρεναρχή κατά την παιδική ηλικία και οι διαταραχές εμμήνου ρύσεως κυρίως κατά την εφηβεία. Η πλήρης εικόνα του συνδρόμου PCOS ήταν σπάνια στην ομάδα αυτή και επίσης δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ του υποκείμενου γενετικού λάθους και της κλινικής προβολής.

Μέχρι τώρα ένα ευρύ φάσμα μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* έχει περιγραφεί, όπου οι μεταλλάξεις αυτές στη πλειονότητα τους επηρεάζουν τη κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου και λιγότερο τα ιντρόνια και τον εκκινητή. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι πολυμορφισμοί οι οποίοι εδράζονται στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR) του *CYP21A2*, η οποία εκτός από άλλα στοιχεία περιέχει και μερικές micro-RNA-binding περιοχές έχουν περιγραφεί να σχετίζονται με ήπια μορφή ΣΥΕ (247).

Μεταλλάξεις στη περιοχή 3'UTR ενδέχεται να επηρεάζουν την προδιάθεση για τη νόσο αφού τροποποιούν τη πρωτεΐνη και τις περιοχές σύνδεσης με τις μικροσυστοιχίες RNA (miRNA). Η εξήγηση πιθανόν να προέρχεται από την μείωση της σταθερότητας του mRNA, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της εξόδου

του από τον πυρήνα, η οποία οδηγεί σε μη επαρκή μετάφραση λόγω αλλαγής της δευτερογενούς/τριτογενούς του δομής (248).

Στη παρούσα μελέτη έγινε επιλογή όλων των πιθανών συνδυασμών της ποικιλομορφίας στη περιοχή του εκκινήτη και 3'UTR, που πιθανόν να είχαν σχέση με τη νόσο. Έτσι ο συνδυασμός των 3'UTR απλοτύπων *52 T>C, *440 C>T,*443 T>C και *12 T>C, *52 C>T παρατηρήθηκε σε στατιστικά σημαντικό αριθμό *CYP21A2* ετεροζυγωτών γυναικών με ήπιο φαινότυπο μη κλασσικής μορφής ΣΥΕ και επιπλέον σε όλες που έφεραν τη μετάλλαξη p.Val281Leu. Παρομοίως οι πολυμορφισμοί *12 T>C, *52 C>T βρέθηκαν σε όλες που έφεραν τη μετάλλαξη p.Qln318stop.

Από τα ανωτέρω εικάζεται ότι οι πολυμορφισμοί οι οποίοι ευρίσκονται *in cis* με τη παρανοηματική μετάλλαξη p.Val281Leu και τη σοβαρή μετάλλαξη p.Qln318stop ενδέχεται να συμπεριφέρονται ως μεταλλάξεις σε συνέργεια σε ασθενείς οι οποίοι φέρουν μία μετάλλαξη στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου *CYP21A2*. Η πειραματική απόδειξη της υποτιθεμένης αυτής συνέργειας των συγκεκριμένων πολυμορφισμών αναμένεται να ερευνηθεί *in vitro* σε κυτταρικά μοντέλα.

Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν σπάνιες μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2* τόσο σε μη συσχετιζόμενους πάσχοντες με ΣΥΕ όσο και σε ετεροζυγώτες φορείς. Η εκτενής ανίχνευση μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* με αλληλούχιση του DNA και μέθοδο MLPA αναγνώρισε την παρουσία της μετάλλαξης p.Val304Met σε συνδυασμό με την p.Val281Leu σε πάσχοντες και σε ετεροζυγωτία σε φορείς με βάση την απάντηση της 17 – ΟΗΠ στη διέγερση με ACTH. Η συγκεκριμένη

ήπια μετάλλαξη p.Val304Met έχει περιγραφεί σε ομοζυγωτία σε μία μόνο ασθενή, Ασιατικής καταγωγής 24 χρόνων με κλινική προβολή δασυτρυχισμό, ακμή και αλωπεκία (232). Η σχετικά αυξημένη παρουσία της συγκεκριμένης γενετικής διαταραχής στο δικό μας πληθυσμό πιθανόν να αποτελεί έκφραση του φαινομένου του ιδρυτή.

Η επίσης σπάνια μετάλλαξη p.Ala391Thr αναγνωρίστηκε σαν μόνη γενετική βλάβη σε θήλυ 20 χρόνων με σημεία υπερανδρογοναιμίας και βιοχημικά ευρήματα συμβατά με ετεροζυγωτία. Λειτουργικές μελέτες έδειξαν ότι η μετάλλαξη ανήκει στην ομάδα των διαταραχών που οδηγούν σε μη κλασσική μορφή με μέτρια υπολειπόμενη δραστικότητα της 21 – Υδροξυλάσης 39 και 23% συγκριτικά με υγιείς μάρτυρες για τη μετατροπή της 17 – ΟΗΠ και Προγεστερόνης αντίστοιχα (249).

Ο σπάνιος συνδυασμός της μετάλλαξης p.Phe306insT σε ομοζυγωτία *in cis* και στα δύο αλληλία με την p.Val281Leu ανιχνεύθηκε ως γονότυπος (p.Phe306insT+p.Val281Leu/p.Phe306insT+p.Val281Leu) σε θήλυ νεογνό με κλασσική ΣΥΕ με απώλεια άλατος. Ο συγκεκριμένος γονότυπος, ο οποίος ανιχνεύτηκε τόσο στο μητρικό όσο και στο πατρικό αλληλίο δεν έχει μέχρι τώρα περιγραφεί. Παρά το γεγονός ότι η σοβαρότητα της νόσου καθορίζεται από το ευνοϊκό αλληλίο, στο ανωτέρω παιδί η παρουσία της μετάλλαξης p.Val281Leu δεν κατέστησε ηπιότερη την κλινική προβολή ίσως λόγω της παρουσίας της βλαπτικής μετάλλαξης p.Phe306insT και στα δύο αλληλία.

Η σπάνια μετάλλαξη p.Met283Val, έχει περιγραφεί σε ασθενή με μη κλασσική μορφή της ΣΥΕ στην Αργεντινή Η μετάλλαξη p.Met283Val βρίσκεται κοντά στη

p.Val281Leu και τροποποιεί την ενζυματική δραστικότητα με τον ίδιο μηχανισμό και στο ίδιο ποσοστό με την p.Val281Leu εξ ου και η παρουσία της στη μη κλασσική μορφή (250).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε επίσης η συχνότητα των φορέων σε μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2* για έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης στο γενικό πληθυσμό της Κύπρου. Η γονοτυπική ανάλυση του *CYP21A2* 300 θήλεις και 300 άρρενες υγιείς μάρτυρες απεκάλυψε 27 και 32 μεταλλαγμένα αλληλία αντίστοιχα, οδηγώντας σε μία συχνότητα 9.83% (~1:10). Όπως ήταν αναμενόμενο από τα ευρήματα στις διάφορες ομάδες ασθενών που μελετήθηκαν η μετάλλαξη p.Val281Leu κατείχε τη πρώτη θέση και ακολουθείτο από τις υπόλοιπες p.Qln318stop, p.Pro453Ser, p.Val304Met, p.Pro482Ser και p.Met283Val. Ο ταυτόχρονος έλεγχος και της περιοχής του εκκινήτη του γονιδίου *CYP21A2* σε όλα τα δείγματα δεν απεκάλυψε κανένα μη συνήθη πολυμορφισμό. Επιπρόσθετα η μελέτη με τη μέθοδο MLPA δεν απεκάλυψε μεγάλες απαλείψεις ή/και μετατροπές.

Η ανευρεθείσα συχνότητα φορέων στον πληθυσμό μας φαίνεται να είναι από τις υψηλότερες που έχουν μέχρι τώρα περιγραφεί χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της γονοτυπικής ανάλυσης. Παραπλήσιο ποσοστό 9.5% έχει βρεθεί σε μελέτη 200 ατόμων με Αυστριακή και Γιουγκοσλαβική καταγωγή, που θεωρούνται να ανήκουν στον πληθυσμό της μέσης Ευρώπης (221). Η πλειονότητα των γενετικών λαθών που αναγνωρίστηκε στον συγκεκριμένο πληθυσμό ήταν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων σε ποσοστό 6.5% και μεγάλες απαλείψεις/μετατροπές στο υπόλοιπο 3%. Σε αντιδιαστολή στο δικό μας δείγμα η

πλειονότητα των ανευρεθέντων μεταλλάξεων ήταν ήπιες με εξαίρεση τη σοβαρή p.Qln318stop, χωρίς να βρεθούν απαλείψεις ή μετατροπές. Η αυξημένη παρουσία των ήπιων μεταλλάξεων δικαιολογεί και την αυξημένη συχνότητα της μη κλασσικής μορφής στη Κύπρο και στον ευρύτερο χώρο της Ανατολικής Μεσογείου.

Τόσο στα άρρενα όσο και στα θήλεα αλληλία η συνολική συχνότητα της μετάλλαξης p.Val281Leu ήταν η υψηλότερη (4.33%), συγκριτικά με την ανευρεθείσα (1.75%) στον Ευρωπαϊκό χώρο από τους Baumgartner-Parzer et al και στον Ελληνικό χώρο (2%) από Dacou and Dracopoulou (221, 251). Η διαφορά αυτή οφείλεται στη διαφορετικότητα και ποικιλομορφία του γενετικού υποστρώματος ανάμεσα σε έθνη και χώρες.

Αριθμός μελετών έχουν καταδείξει έντεκα μεταλλάξεις του *CYP21A2* να αναγνωρίζονται ως οι πιο συχνές σε Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς με την p.Val281Leu να είναι η πιο συχνή (252-255). Η συχνότητα του αλληλίου της p.Val281Leu κυριαρχεί στη παρούσα μελέτη τόσο σε ασθενείς και ετεροζυγώτες στην έλλειψη της 21 – Υδροξυλάσης, όσο και στο γενικό πληθυσμό. Παρόμοια υψηλή συχνότητα του p.Val281Leu αλληλίου έχει βρεθεί στον πληθυσμό των Ashkenazi Jews (42%) Ιταλών (34%) (201).

Τα ανωτέρω ευρήματα ερμηνεύονται με το φαινόμενο του ιδρυτή και τις γνωστές ιστορικά μετακινήσεις των πληθυσμών στο Μεσογειακό χώρο, γεγονός που παρατηρείται και σε άλλες παθήσεις που κυριαρχούν στη Κύπρο (256-260). Η Κύπρος, η οποία βρίσκεται στην εσχαιά της Ανατολικής Μεσογείου όχι μόνο γεινιάζει με το Ισραήλ αλλά απετέλεσε και γεωγραφικό σημείο παροδικής

εγκατάστασης κατά τη φάση της μετακίνησης των Ashkenazi Jews στην Ευρώπη(201, 256). Επιπλέον η μετακίνηση πληθυσμών από την Ευρώπη κατά τη διάρκεια της Φραγκοκρατίας και Ενετοκρατίας είχε ως αποτέλεσμα και τη μεταφορά γενετικών λαθών από άτομα Ιταλικής καταγωγής (259).

Η σπάνια μετάλλαξη p.Val304Met, η οποία ανιχνεύτηκε σε 7 περιστατικά από το σύνολο των ασθενών της μελέτης βρέθηκε να υπάρχει στο γενικό πληθυσμό σε ποσοστό 0.8%. Η παρουσία της p.Val304Met σε μία μόνο βιβλιογραφική αναφορά σε ασθενή Ασιατικής καταγωγής και η σχετικά σημαντική ανεύρεση της εδώ επίσης μπορούν να ερμηνευτούν και να αποδοθούν στο φαινόμενο του ιδρυτή, αφού καμία άλλη μελέτη δεν κατέδειξε τόσο υψηλή συχνότητα για τη συγκεκριμένη γενετική διαταραχή (232, 261).

Η παρούσα μελέτη διακρίνεται τόσο για τον αξιόπιστο αριθμό δειγμάτων που έχουν ελεχθεί, όσο και για τις μεθόδους που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση των φορέων. Στις περισσότερες μέχρι τώρα μελέτες η συχνότητα φορέων έχει εκτιμηθεί με βάση τη συχνότητα των πασχόντων με ΣΥΕ ασθενών, γεγονός που ενδέχεται να οδηγεί σε μη πραγματικούς αριθμούς αφού λογικά ένα ποσοστό ιδίως των πασχόντων με μη κλασσική μορφή διαφεύγει της διάγνωσης.

Η συχνότητα των αλληλίων με τη σοβαρή μετάλλαξη p.Qln318stop είναι σημαντική αφού αφορά 25.4% των μεταλλαγμένων αλληλίων του πληθυσμού μας. Η ανευρεθείσα συχνότητα των p.Qln318stop αλληλίων είναι υψηλότερη από αυτές που βρέθηκαν (19% και 12.5%) σε πληθυσμούς Αραβικής καταγωγής (201, 262). Εκτός από αυτή τη σοβαρή μετάλλαξη, καμία από τις ήδη ιδιαίτερα βλαπτικές αναγνωρισθείσες στους πάσχοντες ασθενείς [p.Pro30Leu,

p.F306insT+p.Val281Leu, p.Ile172Asn, μεγάλες απαλείψεις και IVS2-13A/C>G (c.655A/C>G)] μεταλλάξεις δεν ανιχνεύθηκε στο δείγμα του υγιούς πληθυσμού, έτσι που να ερμηνεύεται και η χαμηλή επίπτωση της κλασσικής μορφής της ΣΥΕ στη Κύπρο και πολύ χαμηλότερη από άλλες χώρες της Μεσογείου (194, 196). Εν αντιθέσει με βάση τα αποτελέσματα της συχνότητας των φορέων (1:10 μεταλλαγμένα αλληλία *CYP21A2*) εκτιμάται ότι η συχνότητα της μη κλασσικής μορφής πρέπει να ανέρχεται σε 1:400, αποτελώντας έτσι τη συχνότερη ενδοκρinoπάθεια, η οποία δικαίως χρήζει σπουδής.

4. Συμπεράσματα

Συμπερασματικά στη μελέτη αυτή περιγράφεται το φάσμα των μεταλλάξεων που κυριαρχεί στη Συγγενή Υπερπλασία των Επινεφριδίων στον Ελληνοκυπριακό πληθυσμό. Η συχνότητα και η φύση των γενετικών λαθών που παρατηρείται στο δείγμα της μελέτης προσομοιάζει με αυτές που χαρακτηρίζουν πληθυσμούς από τις πλείστες Ευρωπαϊκές και Μεσογειακές χώρες. Παρά το γεγονός ότι η κλινική έκφραση της πάθησης δεν εξαρτάται απόλυτα από τον υποκείμενο γονότυπο, παρατηρείται μία άριστη συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου, έτσι που να υποστηρίζεται ακόμα περαιτέρω η γνώση ότι το ευνοϊκό αλληλίο χαρακτηρίζει και τον κλινικό φαινότυπο.

Αν και η κλινική έκφραση της μη κλασσικής μορφής δεν οφείλεται αποκλειστικά στον υποκείμενο γονότυπο, η διάκριση μεταξύ ήπιας και σοβαρής μορφής με βάση τη γενετική βλάβη ήταν εφικτή. Μερικές διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν σε συγκεκριμένους γονότυπους ίσως οφείλονται σε μη ακόμα εξευρεθέντες τροποποιητικούς παράγοντες.

Παρά το γεγονός ότι η ΣΥΕ κληρονομείται με αυτόσωμο υπολειπόμενο χαρακτήρα, εν τούτοις φαίνεται ότι θήλεις φορείς μιας παθολογικής μετάλλαξης διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο για εκδήλωση κλινικών σημείων υπερανδρογοναιμίας τόσο στη παιδική όσο και στη μετέπειτα ηλικία. Ως εκ τούτου η μέτρηση της 17 – ΟΗΠ μετά από διέγερση με ACTH καθώς και η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *CYP21A2* καθίστανται απαραίτητα διαγνωστικά

εργαλεία στη διερεύνηση κοριτσιών με πρώιμη αδρεναρχή και εφήβων με δασυτρυχισμό, διαταραχών εμμήνου ρύσεως και συνδρόμου PCOS.

Η μελέτη της συχνότητας των φορέων στο γενικό πληθυσμό κατέδειξε ότι παρά το γεγονός ότι η συχνότητα φορείας είναι υψηλή, οι σοβαρές μεταλλάξεις είναι σπάνιες, έτσι που να δικαιολογείται και η χαμηλή σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές και παραπλήσιες χώρες συχνότητα της κλασσικής μορφής της ΣΥΕ. Αντιθέτως η συχνά παρατηρούμενη μετάλλαξη p.Val281Leu όχι μόνο δεσπόζει στη μη κλασσική μορφή της νόσου αλλά και στο δείγμα των υγιών φορέων. Η αυξημένη παρουσία της ανωτέρω γενετικής βλάβης καθώς και της σπάνιας μετάλλαξης p.Val304Met, πιθανόν να ερμηνεύεται με το φαινόμενο του ιδρυτή και τις γνωστές ιστορικά εγκαταστάσεις και μετακινήσεις εθνών στο νησί.

Η ταυτοποίηση της γενετικής βλάβης και της σημασίας που έχει στην κλινική έκφραση της ΣΥΕ είναι υψίστης αξίας, όχι μόνο για την εντόπιση των ετεροζυγωτών ατόμων, αλλά και για ορθολογιστική γενετική συμβουλή και την απορρέουσα προγεννητική φροντίδα.

5. Περίληψη

Η Συγγενής Υπερπλασία Επινεφριδίων (ΣΥΕ) αποτελεί μία ομάδα διαταραχών, οι οποίες κληρονομούνται με αυτόσωμο υπολειπόμενο χαρακτήρα και χαρακτηρίζονται από ελλειμματική βιοσύνθεση της Κορτιζόλης, λόγω έλλειψης ενός εκ των ενζύμων, τα οποία απαιτούνται για την βιοσύνθεση της στον φλοιό των επινεφριδίων. Η συχνότερη μορφή της ΣΥΕ (95% των περιπτώσεων) οφείλεται σε έλλειψη της 21-υδροξυλάσης, ως αποτέλεσμα γενετικών λαθών στο γονίδιο *CYP21A2*, το οποίο αποτελεί ένα από τα πλέον πολυμορφικά γονίδια.

Τα γενετικά λάθη του γονιδίου *CYP21A2* προέρχονται από δύο τύπους ανασυνδυασμών ανάμεσα στο *CYP21A2* και στο ψευδογονίδιο *CYP21A1P*: άνισες διασταυρώσεις κατά τη διάρκεια της μείωσης, οι οποίες οδηγούν σε απαλείψεις *CYP21A2* και μετατροπές, με αποτέλεσμα την μεταφορά αλλοιωμένων αλληλουχιών από το *CYP21A1P* στο *CYP21A2*, όπου καθίστανται επιζήμιες. Τα γενετικά λάθη του γονιδίου *CYP21A2* ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τον βαθμό της ενζυματικής λειτουργίας και τυπικά ανταποκρίνονται στις τρεις κλινικά μορφές της έλλειψης της 21-Υδροξυλάσης: με απώλεια άλατος - salt-wasting (SW), απλή αρρενοποιητική - simple virilizing (SV), και όψιμης εκδήλωσης- nonclassical (NC) ΣΥΕ. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων παρατηρείται συμφωνία μεταξύ γονοτύπου και φαινοτύπου, αν και δεν είναι πάντα εφικτό να γίνει επακριβώς η πρόβλεψη της κλινικής έκφρασης βάσει της υποκείμενης γενετικής διαταραχής. Οι περισσότεροι ασθενείς ανευρίσκονται να είναι σύνθετοι ετεροζυγώτες, όπου η σοβαρότητα της νόσου καθορίζεται από την δραστηριότητα του λιγότερο επηρεαζόμενου αλληλίου.

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη του φάσματος των μεταλλάξεων που αναγνωρίστηκαν σε Ελληνοκύπριους ασθενείς με ΣΥΕ και η εξακρίβωση της επίδρασης του υποκείμενου γονότυπου στη κλινική έκφραση της πάθησης. Το υλικό της μελέτης απετέλεσαν 218 ασθενείς και 300 υγιείς μάρτυρες, στους οποίους έγινε μοριακή ανάλυση του γονιδίου *CYP21A2* με προσδιορισμό της αλληλουχίας προϊόντων της PCR σε αυτόματο αναλυτή (ABI Sequencer) και με τη μέθοδο MLPA για ανίχνευση διπλασιασμών και μεγάλων απαιείψεων.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα έχουν ως εξής.

1. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις συνολικά, που αναγνωρίστηκαν στους 47 μη συσχετιζόμενους ασθενείς, των οποίων μελετηθήκανε 94 αλλήλια είναι οι p.Val281Leu (54.8 %) και IVS2-13A/C>G (14.9%).
2. Στην ομάδα των 10 ασθενών, οι οποίοι είχαν την κλασσική μορφή της ΣΥΕ η πιο συχνή σημειακή μετάλλαξη ήταν η IVS2-13A/C>G (52.4%).
3. Τα πιο συχνά μοριακά λάθη, που αναγνωρίστηκαν στην ομάδα των 37 ασθενών με την μη κλασσική μορφή ΣΥΕ, είναι η μετάλλαξη p.Val281Leu σε ποσοστό 68.9%, η p.Pro453Ser (6.75%) και οι μεταλλάξεις IVS2-13A/C (4.05%), p.Qln318stop (4.05%) και p.Val304Met (4.05%).
4. Οι ασθενείς με τη μη κλασσική μορφή, που έφεραν συνδυασμό ήπιας/σοβαρής μετάλλαξης σε μεγαλύτερο ποσοστό εκδήλωσαν τη νόσο πριν από την εφηβεία και είχαν υψηλότερα επίπεδα επινεφριδιακών ανδρογόνων.
5. Η συνολική συσχέτιση γονότυπου – φαινότυπου στην παρούσα φάση της μελέτης ήταν 100%. Όλοι οι ασθενείς των ομάδων null, A και B είχαν την

κλασσική (απώλεια άλατος ή απλή αρρενοποιητική) μορφή ΣΥΕ. Όλοι οι ασθενείς της ομάδας C εκδήλωσαν την μη κλασσική μορφή, όπως ήταν αναμενόμενο.

6. Ανάλυση του γονότυπου *CYP21A2* σε 171 θήλεις με κλινική εικόνα υπερανδρογοναιμίας έδειξε τα ακόλουθα:

A. 66 θήλεις βρέθηκαν να έχουν μία μετάλλαξη του γονιδίου *CYP21A2* με την p.Val281Leu να είναι η πιο συχνή, οι οποίες είχαν και τις υψηλότερες τιμές 17-OH Προγεστερόνης.

B. Οι υπόλοιπες 105 θήλεις με κλινικά σημεία υπερανδρογοναιμίας, στις οποίες δεν αναγνωρίστηκε καμία μετάλλαξη στο γονίδιο *CYP21A2* είχαν σε ασυνήθιστα υψηλή συχνότητα 56.1% τον πολυμορφισμό p.Asn493Ser, ο οποίος βρέθηκε να είναι 19.7% στην ομάδα των 66 *CYP21A2* ετεροζυγωτών θηλέων. Επιπρόσθετα σε δείγμα 300 υγιών Κυπρίων μαρτύρων η συχνότητα των φορέων της παραλλαγής p.Asn493Ser εκτιμάται να είναι 37%.

Γ. Η αλληλούχιση της μη μεταφραζόμενης περιοχής 3'UTR του γονιδίου *CYP21A2* στις 66 θήλεις με ένα επηρεασμένο αλληλίο *CYP21A2* έδειξε ότι όσες έφεραν σε ετεροζυγωτία την παρανοηματική μετάλλαξη p.Val281Leu έφεραν επίσης στην περιοχή 3'UTR *in cis* τους πολυμορφισμούς *52 T>C, *440 C>T και *443 T>C και όσες έφεραν την σοβαρή μετάλλαξη p.Qln318stop είχαν επίσης *in cis* τους πολυμορφισμούς *12 T>C και *52 C>T στην ίδια περιοχή του 3'UTR. Αντιθέτως η κατανομή και των δύο ανωτέρω

πολυμορφισμών δεν παρατηρήθηκε σε καμία από τις υπόλοιπες *CYP21A2* ετερόζυγες θήλεις.

7. Οι σπάνιες γενετικές βλάβες που αναγνωρίστηκαν ήταν οι σημειακές μεταλλάξεις p.Val304Met, p.Met283Val, p.Ala391Thr καθώς και ο ασυνήθης συνδυασμός p.Phe306insT+ p.Val281Leu/ p.Phe306insT+ p.Val281Leu.
8. Σε δείγμα 300 κλινικά ασυμπτωματικών ατόμων (150 άνδρες και 150 γυναικών) η συχνότητα φορέων μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* στον Κυπριακό πληθυσμό είναι 9.83%. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που αναγνωρίστηκαν ήταν η ήπια p.Val281Leu (4.3%), ακολουθούμενη από τις p.Qln318stop (2.5%), p.Pro453Ser (1.33%), p.Val304Met (0.83%), p.Pro482Ser (0.67%) και p.Met283Val (0.17%). Οι σοβαρές πέντε μεταλλάξεις, οι οποίες αναγνωρίστηκαν στους ασθενείς της παρούσας μελέτης δεν ανιχνεύτηκαν σε κανένα από τους υγιείς μάρτυρες, έτσι που να ερμηνεύεται η σπανιότητα της κλασσικής μορφής στον πληθυσμό μας.

Από τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται ότι το φάσμα και η συχνότητα των μεταλλάξεων του γονιδίου *CYP21A2* στους Ελληνοκύπριους ασθενείς με ΣΥΕ προσομοιάζει με τις πλέον συχνά ανευρεθείσες γενετικές βλάβες. Παρατηρείται μία εξαιρετική συσχέτιση του γονότυπου με τον κλινικό φαινότυπο, άνκαι μερική διαφωνία είναι λογικά αναμενόμενη, λόγω διαφοράς στην έκφραση του γονιδίου της 21 – Υδροξυλάσης. Μέχρι τώρα η πραγματική εικόνα της συχνότητας των μεταλλαγμένων αλληλίων και συνεπώς φορέων ΣΥΕ λόγω έλλειψης της 21 – Υδροξυλάσης δεν έχει μελετηθεί με

εμπεριστατωμένη μοριακή ανάλυση του γονιδίου *CYP21A2* σε συγκεκριμένο Ευρωπαϊκό πληθυσμό. Στην παρούσα μελέτη έγινε ανίχνευση για μεταλλάξεις του γονιδίου *CYP21A2* σε στατιστικά αξιόπιστο για τον πληθυσμό της χώρας με αλληλούχιση DNA και ανάλυση MLPA για μεταλλάξεις στο γονίδιο *CYP21A2* και στον προμότορά του. Η γνώση της υποκείμενης γενετικής βλάβης είναι αναγκαίο εργαλείο τόσο για την ακριβή διάγνωση και ταυτοποίηση των ασθενών όσο και για την παροχή ορθολογιστικής γενετικής συμβουλής, όταν καθίσταται αναγκαία.

6. Εκτενής περίληψη στην Αγγλική

Molecular Defects of the *CYP21A2* Gene in Greek Cypriot patients with Congenital Adrenal Hyperplasia

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) comprises a group of autosomal recessive disorders of cortisol biosynthesis, which is caused by the loss or severe decrease in the activity of one of the enzymatic steps required for cortisol biosynthesis in the adrenal cortex. The most common form of CAH (95% of all cases) is due to 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) resulting from molecular defect in the steroid 21-hydroxylase (*CYP21A2*) gene, with an overall estimated incidence of 1:10,000 to 1:15,000 live births.

The CYP21A2 gene is one of the most polymorphic human genes and more than 100 alleles have been identified in patients with CAH (Human Gene Mutation Database: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). The *CYP21A2* gene is located on the short arm of chromosome 6, within the region of the major histocompatibility complex (MHC), at a distance of 30 kb from a highly homologous (>95%) pseudogene, designated *CYP21A1P*. The location of the *CYP21A2* gene makes it vulnerable to relatively large genomic recombinations with its homologous gene, *CYP21A1P*. The proximity of these genes and their location within the *HLA* region, which has a high rate of recombination, facilitate such events. The molecular defects of *CYP21A2* may result from 2 types of recombinations between the *CYP21A2* and the *CYP21A1P* pseudogene: unequal crossing-over during meiosis leading to deletion of *CYP21A2* and conversions

that result in transfer of altered sequences from *CYP21A1P* to *CYP21A2*, where they become detrimental.

Genetic defects in the *CYP21A2* gene are classified into three categories depending on the residual enzymatic activity and typically correspond to the three types of 21-OHD: salt-wasting (SW), simple virilizing (SV), and non classical (NC) CAH. *In vitro* studies have shown that mutations resulting in complete inactivation of 21-hydroxylase activity are associated with the SW phenotype, those that reduce 21-hydroxylase activity to approximately 2% are associated with the SV phenotype, whereas those that reduce 21-hydroxylase activity to 10% to 75% are associated with the NC phenotype. In the great majority of cases there is a correlation between genotype and phenotype, although it is not always possible to predict the phenotype on the basis of genotype with accuracy. Most patients are compound heterozygotes, and the severity of the disease is determined by the activity of the less severely affected allele.

The incidence of the genetic defects of 21-OHD has been extensively studied and ethnic specific distribution of mutations has been reported. There is no data about the mutations of *CYP21A2* gene in our population, which is mainly of Greek origin influenced by a genetic impact of surrounding countries. Studies in neighbouring countries in the Mediterranean region have reported as the most prevalent genetic defects: IVS2-13A/C>G, p.Qln318stop, p.Val281Leu and large lesions of the gene. Therefore, we aimed to analyze the types and frequencies of

mutations in the Greek Cypriot patients with 21-OHD and study the correlation between genotype and phenotype.

For the purpose of this work we studied 218 patients and 300 healthy controls. The patients were characterized and grouped based on clinical biochemical and molecular findings. The patients were classified in the SW form when clinical and biochemical findings of renal salt wasting were evident and 17-OHP value higher than 75 nmol/L in the first month of their lives. Severe clinical symptoms of CAH without electrolyte imbalance, 17-OHP values higher than 75 nmol/L were characteristic in patients diagnosed with the SV form. Symptoms of hyperandrogenemia in peripubertal years and 17-OHP levels greater than 30 nmol/L after stimulation with ACTH were used to diagnose the patients with the NC form of CAH. The disease-causing mutations were divided into four mutation groups. The null A and B groups contained alleles with mutations resulting in an enzyme with no activity, hence leading to the classical form of CAH, whereas group C contained genotypes composed by a mild mutation on at least one allele resulting in the NC form.

In all DNA samples the identification of mutations was performed with DNA sequencing of the PCR products of the amplification of the *CYP21A2* gene and with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for detection of deletions and/or conversions. The 3' untranslated region that is 536 nucleotides downstream the TGA stop codon of the *CYP21A2* gene was amplified using specific primer. The statistical analysis was performed by using the SPSS statistical software program and comparisons between the groups were made

using the Student's *t*-paired test, where $p < 0.05$ was considered as statistically significant. The project was approved by the Cyprus National Ethics Committee.

The results of this present work are the following.

1. The most frequent mutations in the total of the 47 non related patients of whom 94 alleles were examined are the p.Val281Leu in 54.8% and IVS2-13A/C>G in 14.9%.
2. In the group of patients with the classic form of CAH, the most common genetic defect was the splice mutation IVS2-13A/C>G in 52.4%.
3. In the 64 unrelated alleles of the 37 patients with the NC form, the most frequent point mutations were p.Val281Leu (68.9%) followed by IVS2-13A/C>G (4.05%), p.Qln318stop (4.05%) and p.Val304Met (4.05%).
4. The patients with the NC form who carried the combination of mild/severe mutations were more likely to manifest the disease earlier as premature adrenarche and had higher levels of adrenal androgens.
5. The correlation of genotype – phenotype at this stage of the study is almost absolute. All patients who belonged to null, A and B groups manifested the classic form (SW and SV) and all patients in group C manifested the NC form of CAH as expected.
6. *CYP21A2* genotype analysis in 171 females (girls, adolescents and women) with clinical manifestation of hyperandrogenemia showed:
A. 66/171 were found to bear one mutation of the *CYP21A2* in heterozygosity with p.Val281Leu being the most frequent and additionally had the highest levels of 17 – OHP.

B. The remaining 105 females with clinical hyperandrogenemia in whom no mutation was identified were found to carry the polymorphism p.Asn493Ser in 56.1%. This percentage is considered as unusually high as this particular polymorphism was detected in 19.7% in the group of the 66 *CYP21A2* heterozygote females and in 37% in the normal population in Cyprus.

C. Extended sequencing of the 3'UTR of the *CYP21A2* in 66 females identified with one affected *CYP21A2* allele demonstrated that the 29 who carried in heterozygosity the mutation p.V281L to also carry in the 3'UTR *in cis* the variants *52 T>C, *440 C>T and *443 T>C. Similarly 9 other heterozygote females with the severe p.Qln318stop mutation were found to also carry in the 3'UTR *in cis* the variants *12 T>C and *52 C>T. Concurrent screening of the *CYP21A2* 3'UTR in 150 control females with no hyperandrogenic symptoms and no detected mutations in the *CYP21A2* gene identified the combination of 3'UTR variants *52 T>C, *440 C>T, *443 T>C in 8% and *12 T>C, *52 C>T in 5.3%.

7. The rare mutations identified in the sample of this study were the point mutations: p.Val304Met, p.Met283Val in combination with the severe IVS2-13A/C and the mild p.Val281Leu, p.Ala391Thr and the unusual combination p.Phe306insT+ p.Val281Leu/ p.Phe306insT+ p.Val281Leu.
8. In a statistically significant sample of 300 (150 men and 150 women) healthy individuals the frequency of *CYP21A2* gene mutations carriers was found to be 9.83%. The most common mutations identified were: p.Val281Leu (4.3%),

p.Qln318stop (2.5%), p.Pro453Ser (1.33%), p.Val304Met (0.83%), p.Pro482Ser (0.67%) and p.Met283Val (0.17%). No severe mutations were detected thereby explaining the low incidence of the classic form of CAH in our population.

In this study we described the spectrum and frequency of *CYP21A2* alleles, as well as the genotype-phenotype relationship in unrelated Greek Cypriot patients with CAH of the 21-OHD form. Additionally we explored the incidence of *CYP21A2* heterozygosity in females with hyperandrogenemia and estimated the carrier frequency of *CYP21A2* mutations in our population.

The most frequent molecular defect in the classical form of CAH, which is rare in Cyprus, is the splice site mutation IVS2-13A/C>G, which is in agreement with most studies reported so far. In the NC form, the prevalent mutation was the p.Val281Leu, as in most populations studied. The overall frequency of p.Val281Leu is however one of the highest found for this mutation both in Greek and other populations in Europe and the Mediterranean area. This mutation is quite common in our population as it was found in 4.3 % in screening of healthy individuals and probably reflects a founder effect.

The genotype phenotype correlation is almost absolute and is in agreement with the fact that the phenotypic expression of 21-OHD is primarily related to the type of the molecular defect and correlates with the less severely mutated allele. This questionable milder missense p.Pro30Leu mutation, although known to reduce

enzyme activity and generally associated with NC form, is often present in patients with more severe signs of androgen excess.

Up to date a large spectrum of mutations in the *CYP21A2* gene has been reported and most of these reported mutations affect the coding region of the gene and to a lesser extent the introns and the promoter. Interestingly, variants located in the 3' untranslated region (UTR) of *CYP21A2* which among other regulatory elements contains several micro-RNA-binding sites have not yet been reported to be associated with CAH. As 3'UTR mutations can influence the disease susceptibility by altering protein and microRNA (miRNA) binding regions, the *CYP21A2* 3'UTR was also screened for mutations in heterozygote hyperandrogenic females and compared with sex-matched healthy controls. A possible involvement of the 3'UTR variants *52 T>C, *440 C>T,*443 T>C and *12 T>C, *52 C>T in the CAH phenotypes of the heterozygous p.V281L and p.Q318stop patients of the present study is highly likable.

The *CYP21A2* genotypic analysis of a cohort of 300 unrelated asymptomatic individuals detected 59 mutated alleles in a total of 600 alleles, which gives a carrier frequency of 9.83%, similar to Middle European individuals of Austrian and Yugoslav origin. The overall frequency of p.Val281Leu was proven to be the highest, which is probably the result of a founder effect and provides an explanation of its high incidence in in the pool of Cypriot NC-CAH patients. In the present study a carrier frequency of 0.8% was also detected for the rare and mild p.Val304Met mutation, which was previously reported only once in the

homozygote state in a female patient of Asian origin and most likely reflects a founder effect as well. None of the 300 subjects tested in the present study were identified with any of the five severe mutations identified in the patients with severe CAH, hence explaining the low incidence of classic CAH in our population.

In conclusion, the previously described major mutations are found to dominate the mutation spectrum of Greek Cypriot patients with CAH. The frequency of the underlying genetic defect in patients with NC-CAH is similar to that observed in most Mediterranean populations. There is an excellent genotype – phenotype correlation in all patients, although differences in phenotypic appearance may appear and caused by still undefined factors modifying *CYP21A2* gene expression. Although the clinical expression of NC-CAH is not solely depended on the genotype, discrimination between mild and severe alleles should be made. The frequency of the underlying genetic defect in heterozygote female patients with hyperandrogenism is similar to that observed in other populations and probably the carrier status for *CYP21A2* can be a factor in the variable phenotype of clinical expression of androgen excess. Finally the frequency of the underlying genetic defects in the Cypriot population is one of highest ever reported and may be considered as a small indication of the carrier frequency of *CYP21A2* mutations that exists within the Mediterranean region. Knowing the genetic defect in correlation and its impact on phenotype is of immense help in judicious clinical practice, antenatal diagnosis and appropriate genetic counselling when needed.

7. Βιβλιογραφία

1. New MI. Ancient history of congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Dev.* 2011;20:202-11.
2. New MI. Pope Joan: a recognizable syndrome. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1993;104:104-22.
3. Georgopoulos NA, Vagenakis GA, Pierris AL. Baubo: a case of ambiguous genitalia in the Eleusinian mysteries. *Hormones (Athens).* 2003 Jan-Mar;2(1):72-5.
4. Bongiovanni AM, Root AW. The adrenogenital syndrome. *N Engl J Med.* 1963 Jun 6;268:1283-9 contd.
5. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev.* 2000 Jun;21(3):245-91.
6. White PC. Genetic diseases of steroid metabolism. *Vitam Horm.* 1994;49:131-95.
7. Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, et al. Submitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome p450_{scc} and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. *J Biol Chem.* 1997 Mar 21;272(12):7899-907.
8. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 β-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev.* 1994 Aug;15(4):421-38.
9. Yanase T, Simpson ER, Waterman MR. 17 α-hydroxylase/17,20-lyase deficiency: from clinical investigation to molecular definition. *Endocr Rev.* 1991 Feb;12(1):91-108.
10. Penning TM. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):281-305.
11. Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. Steroid 5 α-reductase 2 deficiency. *Endocr Rev.* 1993 Oct;14(5):577-93.
12. Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science.* 1992 Aug 28;257(5074):1248-51.
13. Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev.* 1996 Jun;17(3):221-44.
14. Waterman MR, Bischof LJ. Cytochromes P450 12: diversity of ACTH (cAMP)-dependent transcription of bovine steroid hydroxylase genes. *FASEB J.* 1997 May;11(6):419-27.

15. Itoi K, Seasholtz AF, Watson SJ. Cellular and extracellular regulatory mechanisms of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons. *Endocr J.* 1998 Feb;45(1):13-33.
16. Scott LV, Dinan TG. Vasopressin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function: implications for the pathophysiology of depression. *Life Sci.* 1998;62(22):1985-98.
17. Evans RM, Arriza JL. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron.* 1989 Feb;2(2):1105-12.
18. Rainey WE, White, P. Functional adrenal zonation and regulation of aldosterone biosynthesis *Current Opinion in Endocrinology and Diabetes.* [Review]. 1998;5(3):175-82.
19. Barrett PQ, Bollag WB, Isales CM, McCarthy RT, Rasmussen H. Role of calcium in angiotensin II-mediated aldosterone secretion. *Endocr Rev.* 1989 Nov;10(4):496-518.
20. de Peretti E, Forest MG. Pitfalls in the etiological diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the early neonatal period. *Horm Res.* 1982;16(1):10-22.
21. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992 Aug;90(2):584-95.
22. New MI, Lorenzen F, Lerner AJ, Kohn B, Oberfield SE, Pollack MS, et al. Genotyping steroid 21-hydroxylase deficiency: hormonal reference data. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983 Aug;57(2):320-6.
23. Speiser PW, New MI. Genotype and hormonal phenotype in nonclassical 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987 Jan;64(1):86-91.
24. Lejeune-Lenain C, Cantraine F, Dufrasnes M, Prevot F, Wolter R, Franckson JR. An improved method for the detection of heterozygosity of congenital virilizing adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1980 Jun;12(6):525-35.
25. Fiet J, Gueux B, Gourmelen M, Kuttann F, Vexiau P, Couillin P, et al. Comparison of basal and adrenocorticotropin-stimulated plasma 21-deoxycortisol and 17-hydroxyprogesterone values as biological markers of late-onset adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Apr;66(4):659-67.
26. Parker KL, Schedl A, Schimmer BP. Gene interactions in gonadal development. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:417-33.
27. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):405-9.
28. Kousta E, Papathanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones (Athens).* 2010 Jul-Sep;9(3):218-131.

29. Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev.* 1993 Apr;14(2):152-64.
30. Quigley CA, De Bellis A, Marschke KB, el-Awady MK, Wilson EM, French FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr Rev.* 1995 Jun;16(3):271-321.
31. Vilee DB. The development of steroidogenesis. *Am J Med.* 1972 Nov;53(5):533-44.
32. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):361-77.
33. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):672-6.
34. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):378-403.
35. Jost A. Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1970 Aug 6;259(828):119-30.
36. Grumbach MM, Ducharme JR. The effects of androgens on fetal sexual development: androgen-induced female pseudohermaphroditism. *Fertil Steril.* 1960 Mar-Apr;11:157-80.
37. Prader A. [Genital findings in the female pseudo-hermaphroditism of the congenital adrenogenital syndrome; morphology, frequency, development and heredity of the different genital forms]. *Helv Paediatr Acta.* 1954 Jul;9(3):231-48.
38. Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL. The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res.* 1994 Aug 11;22(15):3181-6.
39. Jaaskelainen J, Voutilainen R. Growth of patients with 21-hydroxylase deficiency: an analysis of the factors influencing adult height. *Pediatr Res.* 1997 Jan;41(1):30-3.
40. Funder JW. Aldosterone action. *Annu Rev Physiol.* 1993;55:115-30.
41. Lamberts SW, Bruining HA, de Jong FH. Corticosteroid therapy in severe illness. *N Engl J Med.* 1997 Oct 30;337(18):1285-92.
42. Bornstein SR, Tajima T, Eisenhofer G, Haidan A, Aguilera G. Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice. *FASEB J.* 1999 Jul;13(10):1185-94.
43. Kuhnle U, Land M, Ulick S. Evidence for the secretion of an antimineralocorticoid in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986 May;62(5):934-40.

44. Whitehead FJ, Couper RT, Moore L, Bourne AJ, Byard RW. Dehydration deaths in infants and young children. *Am J Forensic Med Pathol.* 1996 Mar;17(1):73-8.
45. 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 Jan 17;324(3):145-9.
46. Thilen A, Woods KA, Perry LA, Savage MO, Wedell A, Ritzen EM. Early growth is not increased in untreated moderately severe 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr.* 1995 Aug;84(8):894-8.
47. Hauffa BP, Winter A, Stolecke H. Treatment and disease effects on short-term growth and adult height in children and adolescents with 21-hydroxylase deficiency. *Klin Padiatr.* 1997 Mar-Apr;209(2):71-7.
48. Helleday J, Siwers B, Ritzen EM, Carlstrom K. Subnormal androgen and elevated progesterone levels in women treated for congenital virilizing 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Apr;76(4):933-6.
49. London DR. The consequences of hyperandrogenism in young women. *J R Soc Med.* 1987 Dec;80(12):741-5.
50. Speiser PW, Serrat J, New MI, Gertner JM. Insulin insensitivity in adrenal hyperplasia due to nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Dec;75(6):1421-4.
51. Schwarz HP, Jocham A, Kuhnle U. Rapid occurrence of thelarche and menarche induced by hydrocortisone in a teenage girl with previously untreated congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Pediatr.* 1995 Aug;154(8):617-20.
52. Lo JC, Schwitzgebel VM, Tyrrell JB, Fitzgerald PA, Kaplan SL, Conte FA, et al. Normal female infants born of mothers with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Mar;84(3):930-6.
53. Kerlan V, Nahoul K, Le Martelot MT, Bercovici JP. Longitudinal study of maternal plasma bioavailable testosterone and androstenediol glucuronide levels during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Feb;40(2):263-7.
54. Urban MD, Lee PA, Migeon CJ. Adult height and fertility in men with congenital virilizing adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 1978 Dec 21;299(25):1392-6.
55. Willi U, Atares M, Prader A, Zachmann M. Testicular adrenal-like tissue (TALT) in congenital adrenal hyperplasia: detection by ultrasonography. *Pediatr Radiol.* 1991;21(4):284-7.
56. Rutgers JL, Young RH, Scully RE. The testicular "tumor" of the adrenogenital syndrome. A report of six cases and review of the literature on testicular masses in patients with adrenocortical disorders. *Am J Surg Pathol.* 1988 Jul;12(7):503-13.

57. Ehrhardt AA, Meyer-Bahlburg HF. Effects of prenatal sex hormones on gender-related behavior. *Science*. 1981 Mar 20;211(4488):1312-8.
58. Dittmann RW, Kappes MH, Kappes ME, Borger D, Stegner H, Willig RH, et al. Congenital adrenal hyperplasia. I: Gender-related behavior and attitudes in female patients and sisters. *Psychoneuroendocrinology*. 1990;15(5-6):401-20.
59. Berenbaum SA. Effects of early androgens on sex-typed activities and interests in adolescents with congenital adrenal hyperplasia. *Horm Behav*. 1999 Feb;35(1):102-10.
60. Gordon AH, Lee PA, Dulcan MK, Finegold DN. Behavioral problems, social competency, and self perception among girls with congenital adrenal hyperplasia. *Child Psychiatry Hum Dev*. 1986 Winter;17(2):129-38.
61. Hurtig AL, Rosenthal IM. Psychological findings in early treated cases of female pseudohermaphroditism caused by virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Arch Sex Behav*. 1987 Jun;16(3):209-23.
62. Merke DP, Fields JD, Keil MF, Vaituzis AC, Chrousos GP, Giedd JN. Children with classic congenital adrenal hyperplasia have decreased amygdala volume: potential prenatal and postnatal hormonal effects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr;88(4):1760-5.
63. Kuhnle U, Bullinger M. Outcome of congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Surg Int*. 1997 Sep;12(7):511-5.
64. Slijper FM, Drop SL, Molenaar JC, de Muinck Keizer-Schrama SM. Long-term psychological evaluation of intersex children. *Arch Sex Behav*. 1998 Apr;27(2):125-44.
65. Meyer-Bahlburg HF, Gruen RS, New MI, Bell JJ, Morishima A, Shimshi M, et al. Gender change from female to male in classical congenital adrenal hyperplasia. *Horm Behav*. 1996 Dec;30(4):319-32.
66. Abdullah MA, Katugampola M, al-Habib S, al-Jurayyan N, al-Samarrai A, Al-Nuaim A, et al. Ambiguous genitalia: medical, socio-cultural and religious factors affecting management in Saudi Arabia. *Ann Trop Paediatr*. 1991;11(4):343-8.
67. Hochberg Z, Gardos M, Benderly A. Psychosexual outcome of assigned females and males with 46,XX virilizing congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Pediatr*. 1987 Sep;146(5):497-9.
68. Ghizzoni L, Bernasconi S, Virdis R, Vottero A, Ziveri M, Volta C, et al. Dynamics of 24-hour pulsatile cortisol, 17-hydroxyprogesterone, and androstenedione release in prepubertal patients with nonclassic 21-hydroxylase deficiency and normal prepubertal children. *Metabolism*. 1994 Mar;43(3):372-7.
69. Chrousos GP, Loriaux DL, Sherins RJ, Cutler GB, Jr. Unilateral testicular enlargement resulting from inapparent 21-hydroxylase deficiency. *J Urol*. 1981 Jul;126(1):127-8.

70. Witchel SF, Azziz R. Nonclassic congenital adrenal hyperplasia. *Int J Pediatr Endocrinol*. 2010;2010:625105.
71. Kater CE, Biglieri EG, Wajchenberg B. Effects of continued adrenocorticotropin stimulation on the mineralocorticoid hormones in classical and nonclassical simple virilizing types of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985 Jun;60(6):1057-62.
72. Dewailly D, Vantyghem-Haudiquet MC, Sainsard C, Buvat J, Cappoen JP, Ardaens K, et al. Clinical and biological phenotypes in late-onset 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1986 Aug;63(2):418-23.
73. Feldman S, Billaud L, Thalabard JC, Raux-Demay MC, Mowszowicz I, Kuttenn F, et al. Fertility in women with late-onset adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Mar;74(3):635-9.
74. 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 Jul;37(4):650-67.
75. Zerah M, Ueshiba H, Wood E, Speiser PW, Crawford C, McDonald T, et al. Prevalence of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency based on a morning salivary 17-hydroxyprogesterone screening test: a small sample study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Jun;70(6):1662-7.
76. Fitness J, Dixit N, Webster D, Torresani T, Pergolizzi R, Speiser PW, et al. Genotyping of CYP21, linked chromosome 6p markers, and a sex-specific gene in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):960-6.
77. Ibanez L, Bonnin MR, Zampolli M, Prat N, Alia PJ, Navarro MA. Usefulness of an ACTH test in the diagnosis of nonclassical 21-hydroxylase deficiency among children presenting with premature pubarche. *Horm Res*. 1995;44(2):51-6.
78. Kuttenn F, Couillin P, Girard F, Billaud L, Vincens M, Boucekkine C, et al. Late-onset adrenal hyperplasia in hirsutism. *N Engl J Med*. 1985 Jul 25;313(4):224-31.
79. Blanche H, Vexiau P, Clauin S, Le Gall I, Fiet J, Mornet E, et al. Exhaustive screening of the 21-hydroxylase gene in a population of hyperandrogenic women. *Hum Genet*. 1997 Nov;101(1):56-60.
80. Knochenhauer ES, Cortet-Rudelli C, Cunnigham RD, Conway-Myers BA, Dewailly D, Azziz R. Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Feb;82(2):479-85.
81. Witchel SF, Lee PA, Suda-Hartman M, Hoffman EP. Hyperandrogenism and manifesting heterozygotes for 21-hydroxylase deficiency. *Biochem Mol Med*. 1997 Dec;62(2):151-8.
82. Toumba M, Skordis N. Implications for the Management of Ambiguous Genitalia in the Newborn – The Role of the Paediatrician. *Europeanpaediatrics*. 2009;3(1):25-9.

83. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS, Ghizzoni L, Hensle TW, Merke DP, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):4133-60.
84. Pang S, Shook MK. Current status of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Curr Opin Pediatr.* 1997 Aug;9(4):419-23.
85. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, et al. Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics.* 1988 Jun;81(6):866-74.
86. Thil'en A, Nordenstrom A, Hagenfeldt L, von Döbeln U, Guthenberg C, Larsson A. Benefits of neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in Sweden. *Pediatrics.* 1998 Apr;101(4):E11.
87. Brosnan PG, Brosnan CA, Kemp SF, Domek DB, Jelley DH, Blackett PR, et al. Effect of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999 Dec;153(12):1272-8.
88. Tajima T, Fujieda K, Nakae J, Toyoura T, Shimozawa K, Kusuda S, et al. Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jul;82(7):2350-6.
89. Nordenstrom A, Thilen A, Hagenfeldt L, Larsson A, Wedell A. Genotyping is a valuable diagnostic complement to neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 May;84(5):1505-9.
90. Rosler A, Levine LS, Schneider B, Novogroder M, New MI. The interrelationship of sodium balance, plasma renin activity and ACTH in congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977 Sep;45(3):500-12.
91. Kominami S, Ochi H, Kobayashi Y, Takemori S. Studies on the steroid hydroxylation system in adrenal cortex microsomes. Purification and characterization of cytochrome P-450 specific for steroid C-21 hydroxylation. *J Biol Chem.* 1980 Apr 25;255(8):3386-94.
92. Kominami S, Hara H, Ogishima T, Takemori S. Interaction between cytochrome P-450 (P-450C21) and NADPH-cytochrome P-450 reductase from adrenocortical microsomes in a reconstituted system. *J Biol Chem.* 1984 Mar 10;259(5):2991-9.
93. Kominami S, Tagashira H, Ohta Y, Yamada M, Kawato S, Takemori S. Membrane topology of bovine adrenocortical cytochrome P-450C21: structural studies by trypsin digestion in vesicle membranes. *Biochemistry.* 1993 Nov 30;32(47):12935-40.
94. Sevrioukova IF, Peterson JA. NADPH-P-450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. *Biochimie.* 1995;77(7-8):562-72.

95. 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 U S A*. 1986 May;83(9):2841-5.
96. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jul;83(14):5111-5.
97. Miguel RN, Chen S, Nikfarjam L, Kominami S, Carpenter B, Dal Pra C, et al. Analysis of the interaction between human steroid 21-hydroxylase and various monoclonal antibodies using comparative structural modelling. *Eur J Endocrinol*. 2005 Dec;153(6):949-61.
98. 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 Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jan;82(2):521-5.
99. White PC, Grossberger D, Onufer BJ, Chaplin DD, New MI, Dupont B, et al. Two genes encoding steroid 21-hydroxylase are located near the genes encoding the fourth component of complement in man. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(4):1089-93.
100. Krone N, Arlt W. Genetics of congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009 Apr;23(2):181-92.
101. Shen L, Wu LC, Sanlioglu S, Chen R, Mendoza AR, Dangel AW, et al. Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J Biol Chem*. 1994 Mar 18;269(11):8466-76.
102. Sargent CA, Anderson MJ, Hsieh SL, Kendall E, Gomez-Escobar N, Campbell RD. Characterisation of the novel gene G11 lying adjacent to the complement C4A gene in the human major histocompatibility complex. *Hum Mol Genet*. 1994 Mar;3(3):481-8.
103. Tsai LP, Lee HH. Analysis of CYP21A1P and the duplicated CYP21A2 genes. *Gene*. 2012 Sep 10;506(1):261-2.
104. Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, Chung EK, Jones KN, Sotos JF, et al. 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 Jun 19;191(12):2183-96.
105. Tee MK, Thomson AA, Bristow J, Miller WL. Sequences promoting the transcription of the human XA gene overlapping P450c21A correctly predict the presence of a novel, adrenal-specific, truncated form of tenascin-X. *Genomics*. 1995 Jul 20;28(2):171-8.
106. Bristow J, Gitelman SE, Tee MK, Staels B, Miller WL. Abundant adrenal-specific transcription of the human P450c21A "pseudogene". *J Biol Chem*. 1993 Jun 15;268(17):12919-24.

107. Chin KK, Chang SF. The -104G nucleotide of the human CYP21 gene is important for CYP21 transcription activity and protein interaction. *Nucleic Acids Res.* 1998 Apr 15;26(8):1959-64.
108. Speek M, Barry F, Miller WL. Alternate promoters and alternate splicing of human tenascin-X, a gene with 5' and 3' ends buried in other genes. *Hum Mol Genet.* 1996 Nov;5(11):1749-58.
109. John ME, Okamura T, Dee A, Adler B, John MC, White PC, et al. Bovine steroid 21-hydroxylase: regulation of biosynthesis. *Biochemistry.* 1986 May 20;25(10):2846-53.
110. John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jul;83(13):4715-9.
111. Handler JD, Schimmer BP, Flynn TR, Szyf M, Seidman JG, Parker KL. An enhancer element and a functional cyclic AMP-dependent protein kinase are required for expression of adrenocortical 21-hydroxylase. *J Biol Chem.* 1988 Sep 15;263(26):13068-73.
112. Dupont B, Oberfield SE, Smithwick EM, Lee TD, Levine LS. Close genetic linkage between HLA and congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *Lancet.* 1977 Dec 24-31;2(8052-8053):1309-12.
113. Levine LS, Zachmann M, New MI, Prader A, Pollack MS, O'Neill GJ, et al. Genetic mapping of the 21-hydroxylase-deficiency gene within the HLA linkage group. *N Engl J Med.* 1978 Oct 26;299(17):911-5.
114. Pollack MS, Maurer D, Levine LS, New MI, Pang S, Duchon M, et al. Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) by HLA typing. *Lancet.* 1979 May 26;1(8126):1107-8.
115. Laron Z, Pollack MS, Zamir R, Roitman A, Dickerman Z, Levine LS, et al. Late onset 21-hydroxylase deficiency and HLA in the Ashkenazi population: a new allele at the 21-hydroxylase locus. *Hum Immunol.* 1980 Jul;1(1):55-66.
116. Pollack MS, Levine LS, O'Neill GJ, Pang S, Lorenzen F, Kohn B, et al. HLA linkage and B14, DR1, BfS haplotype association with the genes for late onset and cryptic 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1981 Jul;33(4):540-50.
117. Werkmeister JW, New MI, Dupont B, White PC. Frequent deletion and duplication of the steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet.* 1986 Oct;39(4):461-9.
118. 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 Jul 7;319(1):19-23.
119. 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 May;62(5):995-1002.

120. Harada F, Kimura A, Iwanaga T, Shimozawa K, Yata J, Sasazuki T. Gene conversion-like events cause steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Nov;84(22):8091-4.
121. Higashi Y, Tanae A, Inoue H, Fujii-Kuriyama Y. Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450(C21) gene: implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1988 Jan;42(1):17-25.
122. Amor M, Parker KL, Globerman H, New MI, White PC. Mutation in the CYP21B gene (Ile-172----Asn) causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Mar;85(5):1600-4.
123. Urabe K, Kimura A, Harada F, Iwanaga T, Sasazuki T. Gene conversion in steroid 21-hydroxylase genes. *Am J Hum Genet*. 1990 Jun;46(6):1178-86.
124. Higashi Y, Hiromasa T, Tanae A, Miki T, Nakura J, Kondo T, et al. 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*. 1991 Apr;109(4):638-44.
125. Mornet E, Crete P, Kuttenn F, Raux-Demay MC, Boue J, White PC, et al. Distribution of deletions and seven point mutations on CYP21B genes in three clinical forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1991 Jan;48(1):79-88.
126. Wedell A, Thilen A, Ritzen 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 May;78(5):1145-52.
127. Ezquieta B, Oliver A, Gracia R, Gancedo PG. Analysis of steroid 21-hydroxylase gene mutations in the Spanish population. *Hum Genet*. 1995 Aug;96(2):198-204.
128. Carrera P, Bordone L, Azzani T, Brunelli V, Garancini MP, Chiumello G, et al. Point mutations in Italian patients with classic, non-classic, and cryptic forms of steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*. 1996 Dec;98(6):662-5.
129. Levo A, Partanen J. Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for the population history of defective alleles. *Hum Genet*. 1997 Apr;99(4):488-97.
130. Wedell A. Molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency): implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Acta Paediatr*. 1998 Feb;87(2):159-64.
131. Rumsby G, Avey CJ, Conway GS, Honour JW. Genotype-phenotype analysis in late onset 21-hydroxylase deficiency in comparison to the classical forms. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998 Jun;48(6):707-11.

132. Ko TM, Kao CH, Ho HN, Tseng LH, Hwa HL, Hsu PM, et al. Congenital adrenal hyperplasia. Molecular characterization. *J Reprod Med.* 1998 Apr;43(4):379-86.
133. Ordonez-Sanchez ML, Ramirez-Jimenez S, Lopez-Gutierrez AU, Riba L, Gamboa-Cardiel S, Cerrillo-Hinojosa M, et al. Molecular genetic analysis of patients carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: identification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations. *Hum Genet.* 1998 Feb;102(2):170-7.
134. Dardis A, Bergada I, Bergada C, Rivarola M, Belgorosky A. Mutations of the steroid 21-hydroxylase gene in an Argentinian population of 36 patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 1997 Jan-Feb;10(1):55-61.
135. Fardella CE, Poggi H, Pineda P, Soto J, Torrealba I, Cattani A, et al. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection of mutations in CYP21B gene in a Chilean population. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Sep;83(9):3357-60.
136. Bobba A, Marra E, Giannattasio S, Iolascon A, Monno F, Di Maio S. 21-Hydroxylase deficiency in Italy: a distinct distribution pattern of CYP21 mutations in a sample from southern Italy. *J Med Genet.* 1999 Aug;36(8):648-50.
137. 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 Feb;36(2):119-24.
138. Ferenczi A, Garami M, Kiss E, Pek M, Sasvari-Szekely M, Barta C, et al. Screening for mutations of 21-hydroxylase gene in Hungarian patients with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jul;84(7):2369-72.
139. Tusie-Luna MT, Ramirez-Jimenez S, Ordonez-Sanchez ML, Cabello-Villegas J, Altamirano-Bustamante N, Calzada-Leon R, et al. Low frequency of deletion alleles in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency in a Mexican population. *Hum Genet.* 1996 Sep;98(3):376-9.
140. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Arnhold IJ, Medeiros MA, Marcondes JA, et al. Low frequency of CYP2B deletions in Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Hered.* 1999 Jan;49(1):9-14.
141. White PC, New MI, Dupont B. HLA-linked congenital adrenal hyperplasia results from a defective gene encoding a cytochrome P-450 specific for steroid 21-hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Dec;81(23):7505-9.
142. Donohoue PA, Jospe N, Migeon CJ, Van Dop C. Two distinct areas of unequal crossingover within the steroid 21-hydroxylase genes produce absence of CYP21B. *Genomics.* 1989 Oct;5(3):397-406.
143. Globerman H, Amor M, Parker KL, New MI, White PC. Nonsense mutation causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1988 Jul;82(1):139-44.

144. 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 U S A*. 1988 Oct;85(20):7486-90.
145. Tusie-Luna MT, Speiser PW, Domic M, New MI, White PC. A mutation (Pro-30 to Leu) in CYP21 represents a potential nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency allele. *Mol Endocrinol*. 1991 May;5(5):685-92.
146. Hsu LC, Hu MC, Cheng HC, Lu JC, Chung BC. The N-terminal hydrophobic domain of P450c21 is required for membrane insertion and enzyme stability. *J Biol Chem*. 1993 Jul 15;268(20):14682-6.
147. Lajic S, Nikoshkov A, Holst M, Wedell A. Effects of missense mutations and deletions on membrane anchoring and enzyme function of human steroid 21-hydroxylase (P450c21). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Apr 13;257(2):384-90.
148. Ishihara N, Yamashina S, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. Malfolded cytochrome P-450(M1) localized in unusual membrane structures of the endoplasmic reticulum in cultured animal cells. *J Biochem*. 1995 Aug;118(2):397-404.
149. Hu MC, Hsu LC, Hsu NC, Chung BC. Function and membrane topology of wild-type and mutated cytochrome P-450c21. *Biochem J*. 1996 May 15;316 (Pt 1):325-9.
150. Tusie-Luna MT, Traktman P, White PC. Determination of functional effects of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene (CYP21) using recombinant vaccinia virus. *J Biol Chem*. 1990 Dec 5;265(34):20916-22.
151. Chiou SH, Hu MC, Chung BC. A missense mutation at Ile172----Asn or Arg356----Trp causes steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Biol Chem*. 1990 Feb 25;265(6):3549-52.
152. Monier S, Van Luc P, Kreibich G, Sabatini DD, Adesnik M. Signals for the incorporation and orientation of cytochrome P450 in the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*. 1988 Aug;107(2):457-70.
153. Hsu LC, Hsu NC, Guzova JA, Guzov VM, Chang SF, Chung BC. The common I172N mutation causes conformational change of cytochrome P450c21 revealed by systematic mutation, kinetic, and structural studies. *J Biol Chem*. 1996 Feb 9;271(6):3306-10.
154. Barbat B, Bogyo A, Raux-Demay MC, Kuttenn F, Boue J, Simon-Bouy B, et al. Screening of CYP21 gene mutations in 129 French patients affected by steroid 21-hydroxylase deficiency. *Hum Mutat*. 1995;5(2):126-30.
155. 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 Aug;88(2):519-23.

156. Owerbach D, Sherman L, Ballard AL, Azziz R. Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassic steroid 21-hydroxylase deficiency. *Mol Endocrinol.* 1992 Aug;6(8):1211-5.
157. Wedell A, Ritzen EM, Haglund-Stengler B, Luthman H. Steroid 21-hydroxylase deficiency: three additional mutated alleles and establishment of phenotype-genotype relationships of common mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Aug 1;89(15):7232-6.
158. Kerrigan JR, Veldhuis JD, Leyo SA, Iranmanesh A, Rogol AD. Estimation of daily cortisol production and clearance rates in normal pubertal males by deconvolution analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 Jun;76(6):1505-10.
159. Hindmarsh PC. Management of the child with congenital adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009 Apr;23(2):193-208.
160. Shimon I, Kaiserman I, Sack J. Home monitoring of 17 alpha-hydroxyprogesterone levels by filter paper blood spots in patients with 21-hydroxylase deficiency. *Horm Res.* 1995;44(6):247-52.
161. Mirsky HA, Hines JH. Infertility in a man with 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *J Urol.* 1989 Jul;142(1):111-3.
162. Biglieri EG, Kater CE. Mineralocorticoids in congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40(4-6):493-9.
163. Van Wyk JJ, Gunther DF, Ritzen EM, Wedell A, Cutler GB, Jr., Migeon CJ, et al. The use of adrenalectomy as a treatment for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Sep;81(9):3180-90.
164. Zachmann M, Manella B, Kempken B, Knorr-Muerset G, Atares M, Prader A. Ovarian steroidogenesis in an adrenalectomized girl with 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1984 Nov;21(5):575-82.
165. Labrie F, Belanger A, Luu-The V, Labrie C, Simard J, Cusan L, et al. DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids.* 1998 May-Jun;63(5-6):322-8.
166. Wilson BE, Reiner WG. Management of intersex: a shifting paradigm. *J Clin Ethics.* 1998 Winter;9(4):360-9.
167. Gonzalez R, Fernandes ET. Single-stage feminization genitoplasty. *J Urol.* 1990 Apr;143(4):776-8.
168. Bailez MM, Gearhart JP, Migeon C, Rock J. Vaginal reconstruction after initial construction of the external genitalia in girls with salt-wasting adrenal hyperplasia. *J Urol.* 1992 Aug;148(2 Pt 2):680-2; discussion 3-4.

169. Alizai NK, Thomas DF, Lilford RJ, Batchelor AG, Johnson N. Feminizing genitoplasty for congenital adrenal hyperplasia: what happens at puberty? *J Urol*. 1999 May;161(5):1588-91.
170. Premawardhana LD, Hughes IA, Read GF, Scanlon MF. Longer term outcome in females with congenital adrenal hyperplasia (CAH): the Cardiff experience. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997 Mar;46(3):327-32.
171. Speiser PW, Laforgia N, Kato K, Pareira J, Khan R, Yang SY, et al. First trimester prenatal treatment and molecular genetic diagnosis of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab*. 1990 Apr;70(4):838-48.
172. Dorr HG, Sippell WG. Prenatal dexamethasone treatment in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: effect on midgestational amniotic fluid steroid levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Jan;76(1):117-20.
173. Forest MG, Morel Y, David M. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab*. 1998 Sep;9(7):284-9.
174. Lajic S, Wedell A, Bui TH, Ritzen EM, Holst M. Long-term somatic follow-up of prenatally treated children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Nov;83(11):3872-80.
175. Nimkarn S, New MI. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: A paradigm for prenatal diagnosis and treatment. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192:5-11.
176. White PC, Mune T, Agarwal AK. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):135-56.
177. Pang SY, Pollack MS, Marshall RN, Immken L. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med*. 1990 Jan 11;322(2):111-5.
178. New MI, Abraham M, Yuen T, Lekarev O. An update on prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Semin Reprod Med*. 2012 Oct;30(5):396-9.
179. Lajic S, Bui TH, Holst M, Ritzen M, Wedell A. [Prenatal diagnosis and treatment of adrenogenital syndrome. Prevent virilization of female fetuses]. *Lakartidningen*. 1997 Dec 10;94(50):4781-6.
180. Meyer-Bahlburg HF, Dolezal C, Haggerty R, Silverman M, New MI. Cognitive outcome of offspring from dexamethasone-treated pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2012 Jul;167(1):103-10.
181. Lajic S, Nordenstrom A, Hirvikoski T. Long-term outcome of prenatal dexamethasone treatment of 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Dev*. 2011;20:96-105.

182. Lekarev O, Tafuri K, Lane AH, Zhu G, Nakamoto JM, Buller-Burckle AM, et al. Erroneous prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to a duplication of the CYP21A2 gene. *J Perinatol*. 2013 Jan;33(1):76-8.
183. Miller WL, Witchel SF. Prenatal treatment of congenital adrenal hyperplasia: risks outweigh benefits. *Am J Obstet Gynecol*. 2013 May;208(5):354-9.
184. Hirvikoski T, Nordenstrom A, Wedell A, Ritzen M, Lajic S. Prenatal dexamethasone treatment of children at risk for congenital adrenal hyperplasia: the Swedish experience and standpoint. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jun;97(6):1881-3.
185. Dreger A, Feder EK, Tamar-Mattis A. Prenatal Dexamethasone for Congenital Adrenal Hyperplasia: An Ethics Canary in the Modern Medical Mine. *J Bioeth Inq*. 2012 Sep;9(3):277-94.
186. Williams RM, Ward CE, Hughes IA. Premature adrenarche. *Arch Dis Child*. 2012 Mar;97(3):250-4.
187. Cook H, Brennan K, Azziz R. Reanalyzing the modified Ferriman-Gallwey score: is there a simpler method for assessing the extent of hirsutism? *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1266-70 e1.
188. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456-88.
189. White PC, Vitek A, Dupont B, New MI. Characterization of frequent deletions causing steroid 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Jun;85(12):4436-40.
190. Wedell A, Chun X, Luthman H. A steroid 21-hydroxylase allele concomitantly carrying four disease-causing mutations is not uncommon in the Swedish population. *Hum Genet*. 1994 Feb;93(2):204-6.
191. Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, Carroll MC, Porter RR, Campbell RD. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia. *EMBO J*. 1987 Jun;6(6):1653-61.
192. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005 Jun 18-24;365(9477):2125-36.
193. Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med*. 2003 Aug 21;349(8):776-88.
194. Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Reprod Update*. 2004 Nov-Dec;10(6):469-85.
195. Morel Y, Miller WL. Clinical and molecular genetics of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Adv Hum Genet*. 1991;20:1-68.

196. van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2004 Nov;151 Suppl 3:U71-5.
197. Pang S. Congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1997 Dec;26(4):853-91.
198. Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Aug;80(8):2322-9.
199. Mercado AB, Wilson RC, Cheng KC, Wei JQ, New MI. Prenatal treatment and diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to steroid 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Jul;80(7):2014-20.
200. Krone N, Roscher AA, Schwarz HP, Braun A. Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem*. 1998 Oct;44(10):2075-82.
201. Wilson RC, Nimkarn S, Dumic M, Obeid J, Azar MR, Najmabadi H, et al. Ethnic-specific distribution of mutations in 716 patients with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab*. 2007 Apr;90(4):414-21.
202. 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 Jun;86(6):2845-8.
203. Wasniewska M, Di Pasquale G, Rulli I, Salzano G, Caruso M, Indovina S, et al. In Sicilian ethnic group non-classical congenital adrenal hyperplasia is frequently associated with a very mild genotype. *J Endocrinol Invest*. 2007 Mar;30(3):181-5.
204. Wasniewska M, Caruso M, Indovina S, Crisafulli G, Mirabelli S, Salzano G, et al. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: genotypical peculiarities in a Sicilian ethnic group. *J Endocrinol Invest*. 2008 Jul;31(7):607-9.
205. Abid F, Tardy V, Gaouzi A, El Hessni A, Morel Y, Chabraoui L. CYP21A2 gene mutation analysis in Moroccan patients with classic form of 21-hydroxylase deficiency: high regional prevalence of p.Q318X mutation and identification of a novel p.L353R mutation. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(12):1707-13.
206. Sadeghi F, Yurur-Kutlay N, Berberoglu M, Cetinkaya E, Aycan Z, Kara C, et al. Identification of frequency and distribution of the nine most frequent mutations among patients with 21-hydroxylase deficiency in Turkey. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2008 Aug;21(8):781-7.
207. Skordis N, Kyriakou A, Tardy V, Ioannou YS, Varvaresou A, Dracopoulou-Vabouli M, et al. Molecular defects of the CYP21A2 gene in Greek-Cypriot patients with congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res Paediatr*. 2011;75(3):180-6.

208. Gidlöf S, Falhammar H, Thilén A, von Döbeln U, Ritzén M, Wedell A, et al. One hundred years of congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a retrospective, population-based cohort study. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2013;In press.
209. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Feb 12;110(7):2611-6.
210. Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, Ciaccio M, et al. 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 (Oxf)*. 2011 Oct;75(4):427-35.
211. Stikkelbroeck NM, Hoefsloot LH, de Wijs IJ, Otten BJ, Hermus AR, Sistermans EA. CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Aug;88(8):3852-9.
212. 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 Mar;85(3):1059-65.
213. Dolzan V, Solyom J, Fekete G, Kovacs J, Rakosnikova V, Votava F, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol*. 2005 Jul;153(1):99-106.
214. Wilson RC, Wei JQ, Cheng KC, Mercado AB, New MI. Rapid deoxyribonucleic acid analysis by allele-specific polymerase chain reaction for detection of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 May;80(5):1635-40.
215. Owerbach D, Ballard AL, Draznin MB. Salt-wasting congenital adrenal hyperplasia: detection and characterization of mutations in the steroid 21-hydroxylase gene, CYP21, using the polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Mar;74(3):553-8.
216. Jaaskelainen 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 Endocrinol Metab*. 1997 Oct;82(10):3293-7.
217. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Dec;83(12):4416-9.
218. Kotaska K, Lisa L, Prusa R. Common CYP21 gene mutations in Czech patients and statistical analysis of worldwide mutation distribution. *Cent Eur J Public Health*. 2003 Sep;11(3):124-8.

219. Levo A, Jaaskelainen J, Sistonen P, Siren MK, Voutilainen R, Partanen J. Tracing past population migrations: genealogy of steroid 21-hydroxylase (CYP21) gene mutations in Finland. *Eur J Hum Genet.* 1999 Feb-Mar;7(2):188-96.
220. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, Tartaglia L, Cassio A, Mantovani V, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 Jul;53(1):117-25.
221. Baumgartner-Parzer SM, Nowotny P, Heinze G, Waldhausl W, Vierhapper H. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):775-8.
222. Phedonos A, Shammas C, Skordis N, Kyriakides T, Neocleous V, Phylactou L. High carrier frequency of 21-hydroxylase deficiency in Cyprus. *Clin Genet.* 2013 Apr 22.
223. Haider S, Islam B, D'Atri V, Sgobba M, Poojari C, Sun L, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Feb 12;110(7):2605-10.
224. 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 Nov;20(11):2946-64.
225. White PC, New MI. Genetic basis of endocrine disease 2: congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992 Jan;74(1):6-11.
226. Chrousos GP, Munabi A, Cutler GB, Jr., Loriaux DL. Late-onset 21-hydroxylase deficiency. *Ann Intern Med.* 1982 Aug;97(2):281.
227. Speiser PW, Knochenhauer ES, Dewailly D, Fruzzetti F, Marcondes JA, Azziz R. A multicenter study of women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia: relationship between genotype and phenotype. *Mol Genet Metab.* 2000 Nov;71(3):527-34.
228. Azziz R, Sanchez LA, Knochenhauer ES, Moran C, Lazenby J, Stephens KC, et al. Androgen excess in women: experience with over 1000 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Feb;89(2):453-62.
229. Bidet M, Bellanne-Chantelot C, Galand-Portier MB, Tardy V, Billaud L, Laborde K, et al. Clinical and molecular characterization of a cohort of 161 unrelated women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency and 330 family members. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009 May;94(5):1570-8.
230. Skordis N, Shammas C, Efstathiou E, Kaffe K, Neocleous V, Phylactou LA. Endocrine profile and phenotype-genotype correlation in unrelated patients with non-classical congenital adrenal hyperplasia. *Clin Biochem.* 2011 Aug;44(12):959-63.

231. Ezquieta B, Cueva E, Varela J, Oliver A, Fernandez J, Jariego C. Non-classical 21-hydroxylase deficiency in children: association of adrenocorticotrophic hormone-stimulated 17-hydroxyprogesterone with the risk of compound heterozygosity with severe mutations. *Acta Paediatr.* 2002;91(8):892-8.
232. Lajic S, Clauin S, Robins T, Vexiau P, Blanche H, Bellanne-Chantelot C, et al. Novel mutations in CYP21 detected in individuals with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2824-9.
233. Mornet E, Gibrat JF. A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet.* 2000 Mar;106(3):330-9.
234. Janner M, Pandey AV, Mullis PE, Fluck CE. Clinical and biochemical description of a novel CYP21A2 gene mutation 962_963insA using a new 3D model for the P450c21 protein. *Eur J Endocrinol.* 2006 Jul;155(1):143-51.
235. Admoni O, Israel S, Lavi I, Gur M, Tenenbaum-Rakover Y. Hyperandrogenism in carriers of CYP21 mutations: the role of genotype. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006 Jun;64(6):645-51.
236. Paris F, Tardy V, Chalancon A, Picot MC, Morel Y, Sultan C. Premature pubarche in Mediterranean girls: high prevalence of heterozygous CYP21 mutation carriers. *Gynecol Endocrinol.* 2010 May;26(5):319-24.
237. Ghizzoni L, Cappa M, Vottero A, Ubertini G, Carta D, Di Iorgi N, et al. 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 Aug;165(2):307-14.
238. Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jan;96(1):E161-72.
239. Azziz R, Wells G, Zacur HA, Acton RT. Abnormalities of 21-hydroxylase gene ratio and adrenal steroidogenesis in hyperandrogenic women with an exaggerated 17-hydroxyprogesterone response to acute adrenal stimulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Dec;73(6):1327-31.
240. Settas N, Dracopoulou-Vabouli M, Dastamani A, Katsikis I, Chrousos G, Panidis D, et al. CYP21A2 Mutations in Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Horm Metab Res.* 2013 Feb 5.
241. Neocleous V, Shamma C, Phedonos AP, Karaoli E, Kyriakou A, Toumba M, et al. Genetic defects in the cyp21a2 gene in heterozygous girls with premature adrenarche and adolescent females with hyperandrogenemia. *Georgian Med News.* 2012 Sep(210):40-7.
242. Lee HH, Kuo JM, Chao HT, Lee YJ, Chang JG, Tsai CH, et al. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Feb;85(2):597-600.

243. Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, 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 May;52(5):601-7.
244. Weintrob N, Brautbar C, Pertzlan A, Josefsberg Z, Dickerman Z, Kauschansky A, et al. Genotype-phenotype associations in non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2000 Sep;143(3):397-403.
245. Witchel SF, Lee PA. Identification of heterozygotic carriers of 21-hydroxylase deficiency: sensitivity of ACTH stimulation tests. *Am J Med Genet*. 1998 Apr 1;76(4):337-42.
246. Bachega TA, Brenha EM, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, et al. 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 Feb;87(2):786-90.
247. Menabo S, Balsamo A, Baldazzi L, Barbaro M, Nicoletti A, Conti V, et al. A sequence variation in 3'UTR of CYP21A2 gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest*. 2012 Mar;35(3):298-305.
248. Chen JM, Ferec C, Cooper DN. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet*. 2006 Aug;120(1):1-21.
249. Robins T, Bellanne-Chantelot C, Barbaro M, Cabrol S, Wedell A, Lajic S. Characterization of novel missense mutations in CYP21 causing congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med*. 2007 Mar;85(3):247-55.
250. Minutolo C, Nadra AD, Fernandez C, Taboas M, Buzzalino N, Casali B, et al. Structure-based analysis of five novel disease-causing mutations in 21-hydroxylase-deficient patients. *PLoS One*. 2011;6(1):e15899.
251. Dacou-Voutetakis C, Dracopoulou M. High incidence of molecular defects of the CYP21 gene in patients with premature adrenarche. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 May;84(5):1570-4.
252. Lee HH, Chao HT, Ng HT, Choo KB. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J Med Genet*. 1996 May;33(5):371-5.
253. Dolzan V, Stopar-Obreza M, Zerjav-Tansek M, Breskvar K, Krzisnik C, Battelino T. Mutational spectrum of congenital adrenal hyperplasia in Slovenian patients: a novel Ala15Thr mutation and Pro30Leu within a larger gene conversion associated with a severe form of the disease. *Eur J Endocrinol*. 2003 Aug;149(2):137-44.
254. 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 Aug;48(8):1057-62.

255. Krone N, Braun A, Weinert S, Peter M, Roscher AA, Partsch CJ, et al. Multiplex minisequencing of the 21-hydroxylase gene as a rapid strategy to confirm congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem*. 2002 Jun;48(6 Pt 1):818-25.
256. Shammas C, Neocleous V, Toumba M, Costi C, Phedonos AA, Efstathiou E, et al. Overview of genetic defects in endocrinopathies in the island of Cyprus; evidence of a founder effect. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012 Sep;16(9):1073-9.
257. Yiallourous PK, Neocleous V, Zeniou M, Adamidou T, Costi C, Christophi C, et al. Cystic fibrosis mutational spectrum and genotypic/phenotypic features in Greek-Cypriots, with emphasis on dehydration as presenting symptom. *Clin Genet*. 2007 Mar;71(3):290-2.
258. Deltas C, Gale D, Cook T, Voskarides K, Athanasiou Y, Pierides A. C3 Glomerulonephritis/CFHR5 Nephropathy Is an Endemic Disease in Cyprus: Clinical and Molecular Findings in 21 Families. *Adv Exp Med Biol*. 2013;734:189-96.
259. Skordis N, Neocleous V, Kyriakou A, Efstathiou E, Sertedaki A, Philibert P, et al. The IVS1-2A>G mutation in the SRD5A2 gene predominates in Cypriot patients with 5alpha reductase deficiency. *J Endocrinol Invest*. 2010 Dec;33(11):810-4.
260. Elia A, Voskarides K, Demosthenous P, Michalopoulou A, Malliarou MA, Georgaki E, et al. Founder mutations in the ATP6V1B1 gene explain most Cypriot cases of distal renal tubular acidosis: first prenatal diagnosis. *Nephron Clin Pract*. 2011;117(3):c206-12.
261. Neocleous V, Ioannou YS, Bartsota M, Costi C, Skordis N, Phylactou LA. Rare mutations in the CYP21A2 gene detected in congenital adrenal hyperplasia. *Clin Biochem*. 2009 Sep;42(13-14):1363-7.
262. Kharrat M, Riahi A, Maazoul F, M'Rad R, Chaabouni H. Detection of a frequent duplicated CYP21A2 gene carrying a Q318X mutation in a general population with quantitative PCR methods. *Diagn Mol Pathol*. 2011 Jun;20(2):123-7.

Μερική χρηματοδότηση της παρούσας διατριβής από το ερευνητικό πρόγραμμα ***“The prevalence of Non Classical Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-OHD in Cypriot females with Hyperandrogenism and Ovarian Dysfunction”*** July, 2010. Cyprus Research Promotion Foundation Total Funding: 175,120 Euro. (Αρ. Πρωτ. ΥΓΕΙΑ/ΔΥΓΕΙΑ/0609(BIE0/27)).