

Konjenital Adrenal Hiperplazi Genetiği

GENETICS OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

Dr.Güler ÖZER,^a Dr.U. Güney ERGÜN^b

^a Pediatrik Endokrinoloji ve Metabolizma BD, ^b Aile Hekimliği AD, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi ADANA

Özet

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), kortizol sentezini sağlayan enzimlerin konjenital eksikliği sonucu oluşan, otozomal resesif kalımla geçen ve sık görülen metabolik ve endokrin bir hastalıktır.

21 hidroksilaz eksikliği: KAH vakalarının %90'ına neden olur. 21 hidroksilaz enzimini kodlayan genin iki ayrı formu mevcuttur; aktif gen (CYP21) ve psödogen (CYP21P). Her iki genin, hatalı eşleşme ve eşdeğer olmayan çaprazlaşmaları ve DNA dizisinin intergenik rekombinasyonu sonucu psödogende doğal bulunan mutasyonlar aktif gene aktarılır. Mutasyonların %90'ı bu şekilde olurken %10'u "de novo" oluşur. Vaka serilerinde delesyon (%8-36), CYP21/CYP21P büyük gen konversiyonları (%3-15), duplikasyon (%2-9), nokta mutasyonları (%36-86) değişik oranlarda verilmiştir. Doğru ve güvenilir moleküler tanı için analiz metotları geliştirilmiştir. *In vitro* ekspresyon çalışmalarında substrat-fonksiyon ilişkisi incelenmiştir.

11 hidroksilaz eksikliği: Bu enzimin geni olan CYP11 B1, kromozom 8q21-q22 de bulunur. Ekspresyon çalışmaları ile substrat-fonksiyon ilişkisi incelenmiştir. Japonya ve Fransa'da 11 hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH vakalarında CYP11 B1/CYP11 B2 hibrid geni bulunmuştur.

3 beta hidroksisteroid dehidrogenaz eksikliği: Bu enzimin iki izoenzimini kodlayan HSD3 B1 ve HSD3 B2 genleri kromozom 1p13.1'te bulunur. HSD3 B2 geninin ekspresyonu adrenal ve gonadlarda aktiftir. Hastalığın ağır (tuz kaybı) ve basit tipinde mutasyonlar tanımlanmış ve *in vitro* ekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

17 hidroksilaz eksikliği: Steroid 17 hidroksilaz enzimini kodlayan CYP17 geni, kromozom 10q24-q25'te bulunur. Yirmiden fazla genetik defekt tanımlanarak *in vitro* ekspresyon çalışmaları ile substrat-fonksiyon ilişkisi incelenmiştir.

Konjenital lipoid adrenal hiperplazi (KLAH): Kromozom 15q23-q24'te bulunan CYP11 A geninde kompozit heterozigot mutasyon tanımlanarak *in vitro* ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Kromozom 8p11,2 de bulunan StAR geninde çalışmalar sürmektedir.

Abstract

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is a common, autosomal recessively inherited, metabolic and endocrinologic disorder caused by a deficiency in one of the enzymes necessary for the synthesis of cortisol in the adrenal cortex.

21 hydroxylase deficiency: More than 90% of all cases of CAH is caused by 21 hydroxylase deficiency. The gene which codes 21 hydroxylase has two separate forms, a functional gene (CYP21) and a nonfunctional pseudogene (CYP21P). Due to the un-reciprocal coupling, unequal cross over and inter-genic recombination of the DNA strings of the both genes, the mutation which naturally appears on the pseudogene is transferred onto the active gene. The 90% of the mutations forms in that way, while the other 10% appears *de novo*. Deletions (8-36%), duplications (2-9%), point mutations (36-38%) and CYP21/CYP21P gene conversions (3-15%) have been seen with different percentages in case studies. For accurate and reliable molecular diagnosis various analysis methods have been developed. Substrate-function interference is studied with *in vitro* expression studies.

11 hydroxylase deficiency: The gene CYP11 B1 of this enzyme is localized to chromosome 8q21-q22. Its expression is weak in the zona fasciculata and it only arranges 11 hydroxylation. Structure-function inferences are investigated with expression studies. In Japan and France, the CYP11B1/CYP11B2 hybrid gene has been found in CAH cases that have occurred as a consequence of 11 hydroxylase deficiency.

3 beta hydroxysteroid dehydrogenase (HSDs) deficiency: HSD3 B1 and HSD3 B2 genes, which code the two isoenzymes, are localized to chromosome 1p13,1. Expression of the HSD3 B2 gene is active in the adrenals and gonads. The mutations have been correlated with the severe (salt-wasting type) and simple types of disease and *in vitro* expression studies have been performed.

17 hydroxylase deficiency: CYP17 gene, which codes the 17 hydroxylase, is localized to chromosome 10q24-q25. Substrate-function interference have been studied in *in vitro* expression studies and more than 20 genetic deficiencies have been defined.

Congenital lipoid adrenal hyperplasia (CLAH): *In vitro* expression studies have been performed to define the compound heterozygous mutations on the CYP11A gene, which is localized to chromosome 15q23-q24. Investigations are still being carried on with respect to StAR gene, which is localized to chromosome 8p11,2.

Anahtar Kelimeler: Konjenital adrenal hiperplazi, genetik yaklaşım

T Klin Tıp Bilimleri 2004, 24:68-77

Key Words: Congenital adrenal hyperplasia, genetical approach

T Klin J Med Sci 2004, 24:68-77

Geliş Tarihi/Received: 27.02.2003

Kabul Tarihi/Accepted: 11.12.2003

Yazışma Adresi/Correspondence: Dr.Güler ÖZER
Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi
Çocuk Kliniği, 01330, Balcalı, ADANA
gozer@mail.cu.edu.tr

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH) kortizol sentezini sağlayan enzimlerin (p450 SCC (cholesterol side-chain enzyme) kolesterol yan zincir klevajını sağlayan enzim ve StAR (steriodogenic acute regulatory

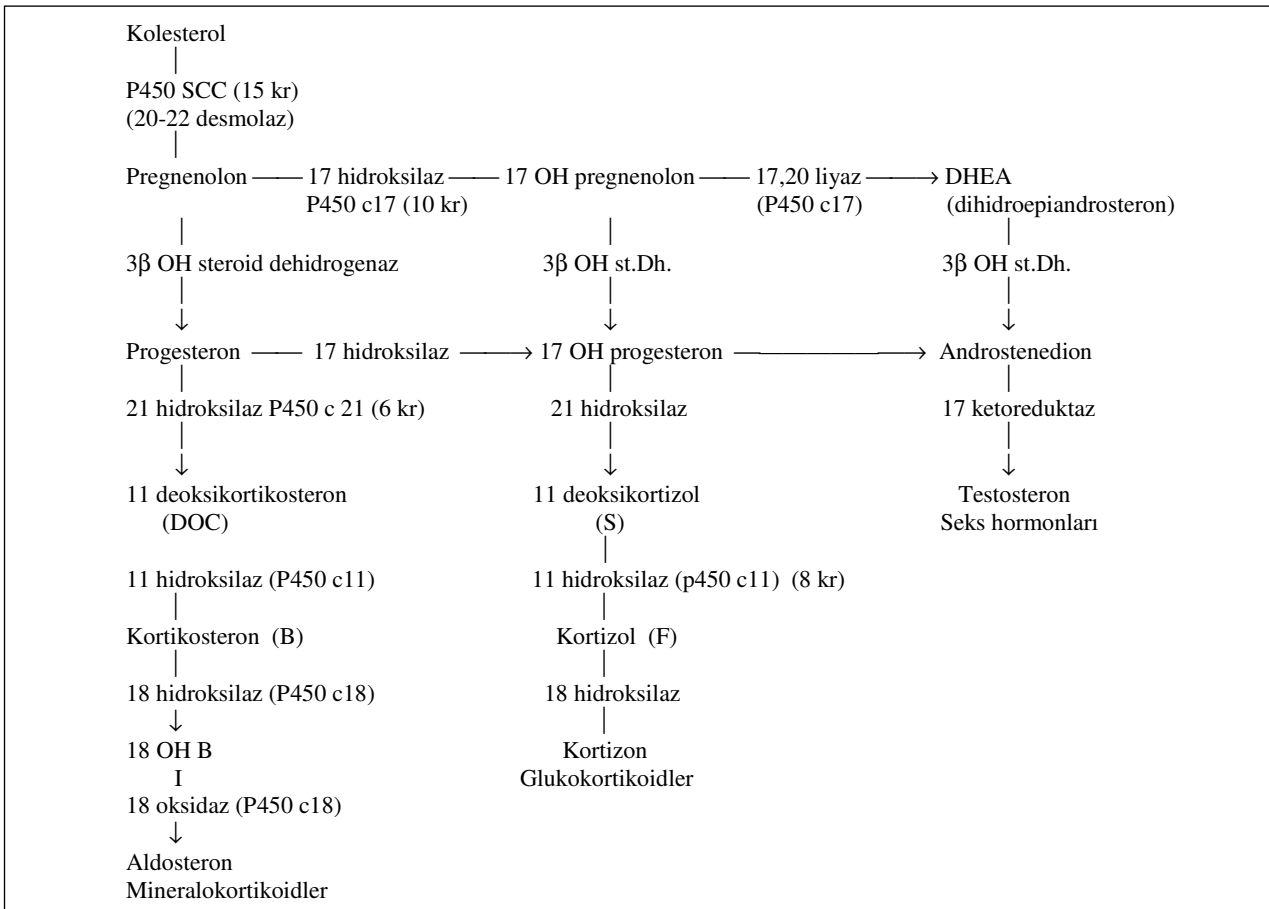
proteini, 3-beta hidroksisteroid dehidrogenaz, 17 hidroksilaz, 21 hidroksilaz ve 11 hidroksilaz) konjenital eksikliği ve fonksiyonel bozukluğu sonucu oluşan, otozomal resesif kalıtımla geçen, sık görülen genetik, endokrin ve metabolik bir hastalıktır. Vakaların %90'ı steroid 21 hidroksilaz eksikliği sonucu oluşur. Diğer enzim eksikliklerine bağlı KAH vakaları daha nadirdir^{1,2} (Şekil 1).

21 Hidroksilaz Eksikliği

21 hidroksilaz enzimi, 17 hidroksiprogesteronun 11-deoksikortizole; progesteronun da deoksikortikosterona (DOC) dönüşümünü kataliz eder. 21 hidroksilaz eksikliğine bağlı konjenital adrenal hiperplazinin klinik tablosu, 'klasik' ve 'klasik olmayan' tip olarak ikiye ayrılır. Yenidoğan evresinde bulgu veren klasik tip; androjen etkisi (serumda 17 hidroksiprogesteron, DHEA ve testosteron yükselmesi sonucu) tek başına bulunursa 'klasik basit virilizan tip' ve tuz kaybı

virilizan tip' ve tuz kaybı ile birlikte bulunursa 'klasik tuz kaybeden tip' olarak tanımlanır. Hastalığın geç başlayan (GB) formu (klasik olmayan) hafif seyirli olup daha geç yaşta bulgu verir. Klinik tablodaki farklılıklar 21 hidroksilaz genindeki mutasyonların oluşturduğu yapısal ve fonksiyonel değişikliklere bağlıdır.

İki steroid 21 hidroksilaz geni (CYP21 aktif gen, CYP21P psödogen) 6. kromozomun kısa kolu (p21) üzerinde MHC (Major Histocompatibility Complex)'nin Klas III bölgesi içinde bulunur. Hastalık bu nedenle HLA tipleriyle bağlantılı olup aktif gen (fonksiyonel) ile psödogen, kompleman komponentlerini (C4 A, C4 B) kodlayan genlerle çift üniteler şeklinde (C4 A-CYP21P-C4 B-CYP21) lineer dizi oluşturur. Her iki gen birbirinden 30 kb uzaklıkta ve her biri 3.1 kb uzunluğunda olup 10 ekzon içerir. Nukleotid dizileri ekzonlara göre %98, intronlara göre %96 homologdur.



Şekil 1. Steroid sentezi.

CYP21P'de çok sayıda bulunan doğal nokta mutasyonları nedeniyle psödogen ekspresyonu zayıftır. Fonksiyonu bilinmeyen CYP21P transkriptlerinin ve CYP21P gen promoter dizi varyantlarının etkinliği, aktif gene göre çok zayıftır. Aktif genin (CYP21) kodladığı 21 hidroksilaz enzimi, enzimatik aktiviteyi tam olarak sağlar. Aktif genin defektine neden olan mutasyonlar aktif ve psödogenin birbirine çok yakın ve yüksek derecede homolog olmasından kaynaklanır. Bu özellikler; kardeş kromatidler arasında aktif ve psödogenin hatalı eşleşme ve eşdeğer olmayan çaprazlaşmalarına (unequal cross over) ve bunun sonucunda DNA dizisinin intergenik rekombinasyonuna bağlı olarak delesyonlara, duplikasyonlara, gen konversiyonlarına ve nokta mutasyonlarına neden olur. Mutasyonların %90 dan fazlası bu şekilde olur. Geriye kalanlar CYP21'de yeni oluşmuş 'de novo' mutasyonlardır.^{1,2}

Delesyon olayları, 21 hidroksilaz eksikliği olan hasta kromozomlarının %20-25'ini kapsar. Bunların içinde en sık olanı, 30 kb'lık DNA zincirinin delesyonudur. Bu delesyon alanı CYP21P'nin 3' kısmını, C4B'nin tümünü ve CYP21'in 5' kısmını içine alır. Delesyon sınırları farklı kromozomlarda değişebilir. En sık CYP21'in 3 ile 8'inci ekzonları arasını kapsar. Bu delesyon hemen daima hibrid gen oluşturur. Hibrid genin 5' ucu CYP21P'den türeyen nukleotid dizilerini (promoter bölgesi dahil) içerdiği için bu hibrid genin etkinliği yetersizdir. Buna bağlı olarak mutant 21 hidroksilaz enziminin aktivitesi yeterli değildir.¹

Gen konversiyonları, CYP21 nokta mutasyonlarını sıklıkla üreten bir mekanizmadır. Gen konversiyonu, homolog genetik enformasyonun karşılıklı olmayan (non-resiprokal) değişimini içerir. İki kromatidde CYP21 ve CYP21P genlerinin hatalı meiotik dizi oluşturması sonucu CYP21'in baz dizisini içeren bir segment, CYP21P'ninki ile yer değiştirir. Bu şekilde CYP21P'den CYP21'e zararlı mutasyonlar transfer olur. Bazı hastalarda C4B-CYP21 dizisinin, C4A-CYP21P dizisiyle yer değiştirdiği gösterilmiştir. Büyük gen konversiyonları denilen bu durum, tuz kaybeden tip klasik KAH vakalarındaki mutasyonların %15'inden sorumludur.¹

Çeşitli mutasyon tiplerinin ve bunlara tekabül eden HLA haplotiplerinin sıklığı literatürde değişik oranlarda verilmiştir. CYP21 nokta mutasyonları vaka serilerinde en sık (%36-86) görülendir. CYP21 delesyonu (%8-36), CYP21/CYP21P büyük gen konversiyonu (%3-15), CYP21P duplikasyonu (%2-9) değişik oranlarda bulunmuştur.^{1,3} HLA haplotid çalışmalarında en sık görülen HLA antijenleri; Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 27 pedigride BW47, İsveç ve İrlanda'da 32 pedigride B40, Fransa'da 53 pedigride B12, Almanya'da 33 pedigride B5'dir. BW47 haplotipi ile bağlantılı CYP21 delesyonu, Kuzey Avrupa ülkeleriyle ABD'de Kuzey Avrupa orijinli şahıslarda bulunmuştur. HLA BW47 ile bağlantılı delesyon, komplike genetik mekanizmalara bağlıdır. HLA B14 DRI haplotidi ABD'de populasyonun %8-9'da olup bunların yarısı P28IL mutasyonu ile bağlantılı olarak klasik olmayan KAH vakalarında bulunmuştur.¹ Çeşitli çalışmalarda hastalığın klasik tipi için; delesyon (%8-39)³⁻¹⁰ büyük gen konversiyonları (%5-14),^{5,6,10-12} Int 2 splice (%23-42),^{3-5,7-9,11,13} I172 N (%5-39),^{4,5,8,10,13} Q 318X (%29-22),^{3,8,14} R356W (%13-19),^{13,15} P30L (%10-19),^{8,16} V281L (%3.7)⁵ gibi mutasyonların sıklığı değişik oranlarda verilmiştir. Klasik olmayan KAH için; V281L (%32-86),^{5,8,11,16} Int 2 splice (%15),⁵ I172 N (%7-10),^{5,14} P30L (%16-21),^{8,16} P453 S (%5-16),^{3,5,8,14,16} R356W (%6-10),^{2,13} gen konversiyonu (%1-4)^{5,12} ve delesyonlar (%2-4)^{5,12} gibi mutasyonların sıklığı değişik oranlarda bulunmuştur.

Bu çalışmalarda tuz kaybeden (TK) klasik KAH için %90-100, basit virilizan (BV) klasik KAH için %75-95 ve geç başlayan (GB) (klasik olmayan) KAH için %65-95 genotip ve fenotip uyumu saptanmıştır.^{4,8,12,17,18} Bu durum, prenatal tanı ve genetik danışmanlıkta önem kazanır.

Genotip-fenotip uyumsuzluğu; hem ekspresyon çalışmaları ile strüktür-fonksiyon ilişkisinin incelenmesine hem de doğru ve güvenilir moleküler analiz metotlarının geliştirilmesine yol açmıştır. CYP21 gen lokusunun komplike olması, moleküler analiz ve yorum güçlüklerine neden olmuştur. Bu konu klinik tanı ve taşıyıcılık tayininde önem ka-

zanır.¹⁹ Bu nedenle, homozigot nokta mutasyonlarını, kompond heterozigot mutasyonlardan; fonksiyonel genin konversiyon ve heterozigot delesyonlarını, CYP21P'nin duplikasyonlarından ayırmak ve hastaların çoğunda bulunan hibrid genleri göstermek gibi stratejiler geliştirilmiştir.²⁰ 'Southern blotting' (SB) tekniği delesyon ve büyük gen konversiyonlarını göstermez.²¹ Tek başına PCR²² ve Taq 1 enzimi²³ ile yapılan çalışmalar yanlış moleküler tanıya neden olur. Bu nedenle SB tekniği ile tarama⁸ yapılmakta ve allel spesifik PCR^{8,10,24-26} ile nokta mutasyonları, dizi analizi ile diğer mutasyonlar incelenmektedir. Ayrıca RFLP,^{27,28} CFLP²⁹ ve diğer polimorfizm çalışmaları,^{3,28-30} allel spesifik oligonukleotid hibridizasyon,^{14,19,28} heterodupleks analiz,²⁸ HLA mikrosatellit çalışması,¹⁴ karma primerlerle CYP21 ve hibrid gen PCR³⁰ ve RDB hibridizasyon²⁵ gibi metotlar kullanılmaktadır. Koryonik villus örneğinden alınan DNA'nın allel-spesifik amplifikasyonu, prenatal tanıda kullanılmıştır.³¹ COS-1 kullanılarak transkripsiyon çalışmaları yapılmaktadır.⁴⁰

İnvitro ekspresyon çalışmalarında zararlı oldukları ispatlanmış mutasyonlar; C30T (GB), Int 2 C-T (frame-shift, TK, BV), ekzon 3 8bp del (frame-shift, prematür terminasyon, TK, BV), G172 C (TK, BV), G281T (GB, HLA-B14) ve C453T (GB) dir.¹ 2001 yılına kadar 56 farklı CYP21 mutasyonu rapor edilmiştir. Bunların 15'i, allelerin %90-95'inde bulunmaktadır.³⁰ Bu nedenle CYP21 geninin moleküler çalışmaları, sık görülen mutasyonların taranmasıyla sınırlandırılmıştır. Farklı populasyonlarda 21 hidroksilaz mutasyonlarının tanınması o populasyon için riskli gebeliklerde prenatal tanı ve genetik danışmanlık açısından önem taşır.

CYP21'in en sık rastlanan nokta mutasyonu Intron 2'deki 'frame-shift' mutasyon olup,^{3-5,7-9,11,13} genetik şifrenin okunmasını değiştirerek bağlanma alanının (splicing) değişmesine neden olur.¹ Fenotip spektrumu geniştir. Ekspresyon çalışmaları, 21 hidroksilaz enzim aktivitesini etkileyebilecek birkaç nokta mutasyonunun sinerjistik etkisini göstermiştir.¹

Ekzon 3'de 8 baz çiftini içeren delesyon, genetik şifrenin okunmasını değiştirerek prematür

terminasyon kodonları oluşturur. Messenger RNA (mRNA) dizisi kısaldığı için enzimin moleküler yapısı küçülür ve aktivitesi bozulur. Ekzon 7'deki tek baz insersiyonu aynı etkiyi yapar.² Homozigot P30L mutasyonu GB KAH'a neden olurken, kompond heterozigot (diğer allelde 5'con, I172 N veya hibrid gen) mutasyonu klasik KAH'a neden olur.²¹

Steroid 21 hidroksilaz geninin ekspresyonunu ve steroid hormon etkisini değiştirebilecek regülatuar ve promoter bölgeleri ile ilgili faktörler, çevresel genler, transkripsiyon faktörleri, transport proteinleri ve diğer düzenleyiciler genotip-fenotip uyumsuzluğu üzerinde etkili olmaktadır. KAH'lı hastalarda CYP21'nin 5' kodlama yapmayan bölgesinde gen konversiyonu sonucu oluşan 3 mutasyonun; regülatuar bölgenin yapısını değiştirdiği ve CYP21 geninin transkripsiyonel aktivitesinin regülasyonunu etkileyerek fenotipi etkilediği rapor edilmiştir.³²

Homozigot 30 kb'lık delesyon, klasik KAH'a neden olurken, kompond heterozigot 30 kb'lık delesyonun GB KAH oluşturması; delesyon sınırlarındaki farklılık nedeniyle maternal alleldeki bağlanma (splicing) alanının fonksiyonel olmasına bağlanmıştır.³⁴ İki duplike hibrid gende (CYP21/CYP21P/CYP21) reverse gen konversiyonuna sekonder multiple mutasyonlar tanımlanmıştır.³⁴

Steroid 21 hidroksilaz enziminin 3 boyutlu modeli yapılarak gen defektlerinin hangi önemli noktaları etkileyebileceği incelenmiştir. Molekülün substrat tanıyan alanı ile 'heme' bağlanma alanını etkileyen ağır mutasyonlar enzim aktivitesinin kaybına neden olmaktadır.³⁵

CYP21P'den transfer olmayan ve sadece CYP21'de bulunan mutasyonlar 'de novo' nokta mutasyonlarıdır. İlk tanımlanan 'de novo' mutasyonlar R339 H ve P453 S missense mutasyonlar olup GB KAH fenotipine neden olurlar.^{1,2}

Brezilya'dan; H-28+C ins (frame-shift),³⁶ G424S, 1003 A ins, 1032-1037 del, IVS-2 -2A>G, E351V, H365Y, R408C (frame-shift veya sıkı korunan aminoasitin yer değiştirmesi) 'de novo' mutasyonları rapor edilmiştir.³⁷

Diğer 'de novo' mutasyonlar; Japonya'dan; 246 A del (prematür terminasyon, TK) (P450 polipeptidin mRNA'sı 'Heme' bağlanma bölgesi içermiyor),³⁸ Hindistan'dan; L261P (TK) ve 406C (TK),³⁹ Singapur'dan; Eks 1 21-57 111bp,¹³ İsveç'ten; L300F (enzim strüktürü) V281G (enzim aktivitesi daha fazla bozuluyor),⁴⁰ İtalya'dan W19X, I171N, R426H, P482S, R341P (inaktive edici mutasyonlar) (12), Avusturya'dan Arg 426 His (düşük enzim aktivitesi)⁴¹ ve Arjantin'den R356W (klasik, GB)¹⁵ olarak tanımlanmıştır.

Steroid 21 hidroksilaz enziminin genetiğindeki gelişmelere paralel olarak bir çok ülkede her yenidoğan 21 hidroksilaz eksikliği yönünden taranmaktadır. 17 hidroksiprogesteron, 21 hidroksilaz eksikliğine bağlı KAH'ın tanı ve tedavisinde en önemli plazma parametresidir. Son yıllarda kurutulmuş kan lekelerinde 17 OH progesteronun hızlı, basit ve güvenilir ölçümünü sağlayan spesifik metotlar (mikro-HPLC/ESI-MS/MS) geliştirilmiştir.¹²

11 Hidroksilaz Eksikliği

11 Hidroksilaz enziminin geni CYP11B1, kromozom 8q 21-22'de bulunur. Gen zona fasikülata da aktiftir. 11 hidroksilaz enzimi, 11 deoksikortizolu kortizole, deoksikortikosteron (DOC)'u kortikosterona çevirerek sadece 11 hidroksilasyonu sağlar. CYP11B1 geni ile %93 homolog olan CYP11B2 geni, zona glomerulozada aktif olup aldosteron sentaz enzimini kodlar. Bu enzim DOC'tan aldosterona kadar bütün reaksiyonları (11 beta hidroksilasyon, 18 hidroksilasyon ve 18 dehidrogenasyon) kataliz eder.^{1,2}

CYP11B1 geninde; missense mutasyonlar (V129M, T318M, A331V, E371G, R374Q, V441G, R448H, R448C) ve nonsense mutasyonlar (W116X, K174X, W274X, Q338X, Q356X), küçük insersiyonlar (Ins CTG 446, Ins2bp394), 5bp duplikasyon ve delesyonlar (dl 28bp Eks 2, dl 1 bp Cod32) tanımlanmıştır.¹

CYP11B1 geninde ekson 2-6 ve 8'de sıcak noktalar tanımlanmıştır. Ekson 8'in 8 kodonluk (441-448) segmentinde çok sayıda mutasyon bulunmuştur.⁴² Ekspresyon sistemle analiz edildiğinde V441G ile R448H mutasyonlarının 'heme' de-

mirine 5'inci ligand olarak hizmet eden ve bütün p450 sitokromlarda korunan alanı etkilediği gösterilmiştir. Aynı şekilde T318'in ileri derecede korunduğu ve moleküler oksijeni parçalayan proton transferini kolaylaştırdığı postüle edilmiştir. Bütün nonsense ve frame-shift mutasyonlarda P45011 protein molekülü tam sentezlenmez. CYP11B1 mutasyonlarının strüktür-fonksiyon ilişkisine, invitro ekspresyon çalışmalarıyla önemli açıklamalar getirilmiştir.^{1,47,48}

Ağır virilizasyonu olan beyazlarda kodon 267'de tanımlanan iki mutasyon (G267R ve G267D) nedeniyle oluşan amino asit değişiminin, bağlanma alanını etkileyerek enzimatik aktiviteyi bozduğu tespit edilmiştir.⁴³ Son zamanlarda Brezilyalı bir hastada yeni bir mutasyon (G267S) saptanmıştır.⁴³

CYP11B1 geninde ekson 5'de (T318T) ile int 8'de IVS 8+4A-G bulunan bir hastada ağır hipertansiyon tedaviye cevap vermediği için adrenalektomi yapılmıştır.^{44,45} Invitro adrenal hücrelerde enzim aktivitesi bulunmamıştır. CYP11B1 mRNA'sı RT-PCR ve dizi analizi ile incelendiğinde intron 8 mutasyonu nedeniyle ekson 8'in,^{44,45} ekson 5'teki mutasyon nedeniyle 3-7 eksonlarının⁴⁴ mRNA'da bulunmadığı gösterilmiştir. 'Western blot' analizi ile 43kDa molekül ağırlığında daha küçük p450c11 enzimine ait immünoreaktif band gösterilmiştir.^{44,45} Bu mutasyonların CYP11B1'in bağlanma defektinden sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

Yeni doğan döneminde 11 hidroksilaz eksikliği olan bir vakaya ağır tuz kaybı ve elektrolit bozukluğu nedeniyle kombine 21 hidroksilaz-11 hidroksilaz eksikliği tanısı konulmuştur. DNA analizinde, CYP21 de homozigot Int2 mutasyonu, ebeveynde heterozigot olarak bulunmuştur. CYP11B1 geninin normal olduğu saptanmış olup, androjenlerin 11 beta hidroksilaz enzimini suprese ettiği kabul edilmiştir.⁴⁶

Farede CYP11B1/CYP11B2 gen aranjmanı bulunduğu halde, insanda ilk defa 2001 yılında KAH'lı hastada 'füzyon gen PCR' ve 'Southern blot' tekniği ile gösterilmiştir. Bu hibrid genin, CYP11B2'nin promoter ve ekson 1-4 ile

CYP11B1'in intron4-ekson9 arasındaki kısmı içerdiği ve ekspresyonunun, anjiotensin ve K(+) ile düzenlendiği saptanmıştır.⁴⁷ Mini ekspresyon metodu uygulanan hastanın ikinci CYP11B1 allelinde bulunan IVS 3+16G-T mutasyonunun, bağlanma bölgesine pre mRNA'nın bağlanmasını radikal olarak azalttığı tespit edilmiştir.⁴⁷

Aynı yıl Fransa'da 11 beta hidroksilaz eksikliği ve KAH bulunan bir hastada CYP11B1/CYP11B2 hibrid geni bulunmuştur. Bu gen CYP11B2'nin promoter ve ekson1-6 ile CYP11B1'in ekson 7-9'unu içerdiği saptanmıştır.⁴⁸ Hibrid gende CYP11B1'in promoter ve düzenleyici kısmı bulunmadığından, bu gen zona fasikülatada ve zona retikulariste eksprese olmamıştır. Hibrid gende ayrıca intrakodon I339T mutasyonu bulunmuş ve bu mutasyona uygun mutant komplemanter DNA, COS-1 hücrelerinde eksprese edilmiş ve enzim aktivitesinin fazla bozulmadığı görülmüştür.⁴⁸

3 Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz Eksikliği

3 beta hidroksisteroid dehidrogenazın (HSD) izoenzimlerini kodlayan farklı iki gen (HSD3B1 ile HSD3B2) kromozom 1 p13'de bulunur. Bu izoenzimlerin her ikisi, delta5 3-betahidroksil grubu içeren C21 ve C19 steroidlerini, delta4 3-keton içeren C21 ve C19 steroidlerine birbirinden biraz farklı kinetikle dönüştürürler.^{1,2}

HSD3B2 geninin ekspresyonu steroidojenik dokularda (adrenal ve gonadlar) olduğu halde, HSD3B1 geninin ekspresyonu steroidojenik olmayan dokularda (plasenta, deri, meme dokusu ve karaciğer) olur. Steroid 3 beta HSD enzim eksikliğine bağlı KAH'lı hastalarda HSD3B2 genindeki mutasyonlara bağlı olarak adrenal ve gonadal steroidogenez bozulduğu halde, periferde 3 beta HSD enzim aktivitesi devam eder.^{1,2}

3 beta HSD enzim eksikliğinin tuz kaybından sorumlu moleküler defektleri, 21 hidroksilaz gen defektlerinde kullanılan yaklaşımla tanımlanmıştır. Bu güne kadar çok sayıda mutasyon bulunmuştur.¹

İlk saptanan mutasyonlar; kodon 171'de 'nonsense' mutasyon ile kodon 186'da C insersiyonu ile oluşan 'frame-shift' mutasyondur.

Tuz kaybetmeyen bir hastada saptanan 'missense' mutasyonu (A245P) taşıyan allele kodlanan cDNA'nın transfekte edildiği hücrelerde normal enzim aktivitenin %10'u kazanılmıştır. Bu da mineralokortikoid sentezine yetecek kadar enzim aktivite olduğu gösterilmiştir.¹

Tuz kaybetmeyen hastalarda bağlanma (splicing) bölgelerini etkileyen mutasyonlar da bulunur. Strüktür-fonksiyon ilişkileri, 3 beta HSD enzim eksikliği olan vakalarda incelenmektedir. Geç başlayan hafif formda gen mutasyonu şimdiye kadar bulunmamıştır.¹

Belirsiz genitalya (ambiguous genitalia) nedeniyle 3 beta HSD eksikliği saptanan ve 2 aylıkken kilo alamama ve hiponatremik-hiperkalemik dehidratasyon saptanan bebeğin HSD3B2 geninde yapılan dizi analizinde 4. ekzonda C665C>A bulunmuştur. Bu nukleotid değişikliği P222Q'ya neden olduğu ve enzim aktivitesinin kaybolduğu saptanmıştır.⁴⁹

Hiperpigmente dış genitalyası olan ve 60 günlükken tuz kaybı saptanan 46XX bebeğe 20 aylıkken klasik tuz kaybeden 3 beta HSD tanısı konulmuştur. Genomik DNA'sı, PCR amplifikasyonu ile incelendikten sonra direkt dizi analizi ve jel elektroforezi ile mutasyonlar taranmıştır. Hastada homozigot, ebeveynde heterozigot E135X mutasyonu (prematür terminasyon) bulunmuştur.⁵⁰ 371 aminoasiti olan 3 beta HSD enzimi yerine 134 aminoasiti olan küçük molekülü protein sentezine neden olabileceği kabul edilmiş ve bu ürünün ağır 3 beta HSD'ye neden olabileceği düşünülmüştür.⁵⁰

17 Hidroksilaz Enzim Eksikliği

17 hidroksilaz enzimini kodlayan gen olan CYP17, kromozom 10q 24.3'de bulunur. Nukleotid dizisi ve gen yapısı, CYP21'inkine (her ikisi mikrozomal steroid hidroksilaz geni) benzer. Hastaların CYP17 allelleri incelendiğinde 'missense', 'nonsense', 'frame-shift', 'splicing' mutasyonlar, delesyon ve insersiyonlar şeklinde 20 farklı genetik lezyon bulunmuştur. CYP21'den farklı olarak büyük delesyonlar bulunmamıştır.^{1,2}

Kombine 17 hidroksilaz/17-20 liyaz eksikliği olan fenotipi kadın, genotipi 46 XY olan İtalyan

hasta, 518 baz çifti içeren delesyon kısmına 469 baz çifti içeren yabancı DNA insersiyonu için homozigot bulunmuştur. CYP17 geninin bu defektinin; 2. eksonunun 3' terminal kısmından başlayıp, intron 2 tümünü ve ekson 3'ün 5' terminal kısmını kapsadığı saptanmıştır. Yabancı DNA'nın, E.Coli I ac operon kısmı ile %99 dizi benzerliğinin olduğu ve prematür terminasyon kodonu içerdiği için ileri derecede küçük moleküllü 17 hidroksilaz proteininin oluştuğu gösterilmiştir. Yine kombine 17 hidroksilaz/17-20 liyaz eksikliği olan bir Thai hastada 3 kodon içeren küçük bir delesyon bulunmuştur. İn vitro çalışmalarla bu delesyonun aktivite azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda kombine 17 hidroksilaz/17-20 liyaz eksikliği olan iki İtalyan hastada ekson 1'de Phe93Cys mutasyonu bulunmuştur.⁵¹ Aminoasit substitusyonu, proteinin çok korunmuş bölgesinde olduğundan ve incelenen 100 normal allelde gösterilemediğinden polimorfizm olmadığına karar verilerek Phe93'ün enzimatik aktivite için gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

17 alfa hidroksilaz eksikliğinde hipoaldosteronizm mekanizmasını çözmek için 2 Japon hastanın genomik DNA'sında CYP17 ve CYP11B2 dizi analiz yapılarak, CYP17 geninde bir hastada kodon 243'te 1bp delesyon; diğerinde R415C nokta mutasyonu bulunmuştur.⁵² CYP11B2'de mutasyon olmadığı saptanmıştır. Bu mutant CYP17 genleriyle COS-1 hücrelerde ekspresyon çalışmaları yapıldığında; 1bp delesyonu sonucunda 17 hidroksilaz/17-20 liyaz aktivitesinin kaybolduğu, R415C mutasyonunda ise her iki enzimin aktivitesinin zayıf olduğu bulunmuştur.⁵² Hasta ve kontrollerden alınan mononukleer lökositlerde CYP11B2 mRNA ekspresyonu ile plazma aldosteron sentaz aktivitesinin üzerine renin sekresyon stimülasyonunun etkisi incelenmiştir. Kontrollerde CYP11B2 mRNA ekspresyonu ve buna paralel olarak plazma aldosteron sentaz aktivitesi artarken hastalarda CYP11B2 mRNA ekspresyonunun zayıf olması nedeniyle bu yeni mutasyonların, transkripsiyon seviyesindeki yeni düzenlemelerle plazma aldosteron sentaz aktivitesinin azalmasına neden olabileceği öne sürülmüştür.⁵²

Konjenital Lipoid Adrenal Hiperplazi

Kortizol biyosentezinde kolesterolü pregnolona dönüştüren mitokondrial üç peptid (20-hidroksilaz-22 hidroksilaz-20,22 desmolaz) kolesterol yan zincir klevajından (P450SCC) sorumlu olup, kromozom 15q 23-24'de bulunan CYP11A geni ile kodlanır. Hastalığın tavşan modelinde CYP11A geninde delesyon bulunduğu halde, insanda yakın zamana kadar mutasyon gösterilememiş ve CYP11A mutasyonlarının fetal yaşamları birlikte olamayacağı öne sürülmüştür.^{1,2}

İlk defa 2001'de, Japonya'dan bir hastada, CYP11A geninde kompozit heterozigot mutasyon (paternal allelde ekson 3'de A189V ile maternal allelde ekson 6'da R353W mutasyonu) tanımlanmıştır. Proteinin fonksiyonel ekspresyon çalışmaları ile R353W mutasyonunun enzim aktivitesini tamamen ortadan kaldırdığını gösterilmiştir. A189V mutasyonunun ise ekson 3'de yeni bir alternatif bağlanma 'splice-donor' alanı yaratarak, ekson 3'ün son 61 baz çiftinin eliminasyonuna, okuma şablonunun kaymasına ve 205'inci kodonun, prematür terminasyon kodonuna dönüşmesine neden olarak küçük moleküllü enzim transkripsiyonuna ve aktivite azalmasına neden olduğu gösterilmiştir.⁵³

Kolesterolü mitokondrinin dış kısmından iç kısmına transport eden StAR proteini, steroid sentezinde hız kısıtlayıcı reaksiyon basamağını kontrol eden bir proteindir. StAR geninin transkripsiyon hızı, steroidogenezin başlıca belirleyicisidir. StAR proteini ile ilgili yapısal-fonksiyon çalışmaları, molekülün N terminal kısmının mitokondrial hedef belirleyicisi, C-terminal kısmının ise lipid transferi ile ilgili START alanı olduğunu göstermiştir.⁵⁴ Kromozom 8p11.2'de bulunan StAR genine ait çok sayıda mutasyon (frame-shift, nonsense, missense ve splicing) StAR aktivitesini bozarak lipoid KAH'a neden olur. Bu mutasyonlar proteinin START alanında toplanmıştır.

Bazal ve cAMP bağımlı StAR ekspresyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörleri incelenmiştir. StAR genindeki mutasyonları saptamaya yönelik moleküler genetik çalışmalar sürmektedir.

Son zamanlarda Japonya ve Kore'de Q258X mutasyonu, Filistin'de R182L mutasyonu saptanmıştır. İki kız kardeşte (46XX, 46XY) saptanan homozigot 'splice-site' mutasyon (IVS 1+2 T-G) doğumda primer adrenal yetmezliğe neden olmuştur.⁵⁵ Adrenal yetmezlik saptanan ve fenotipi kız olan 46XY hastada R182H mutasyonu bulunmuştur. StAR'ın lipid transfer eden kısmında bulunan bu mutasyon nedeniyle R182'nin kolesterol transportundaki kritik fonksiyonel rolü üzerinde durulmuştur.⁵⁵

İsviçre'de fenotipi kız, genotipi 46 XY olup 2,5-5 aylıkken adrenal yetmezlik (tuz kaybı) saptanan 3 hastanın, erişkin döneminde; meme gelişiminin olduğu, pubik kılların olmadığı ve normal heteroseksüel oryantasyon sağladıkları görülmüştür. Moleküler çalışmalarda, homozigot (L260P) ve kompozit heterozigot (L260P/L157P ve L260P/629-630 del) mutasyonlar saptanmıştır. Adrenal yetmezliğin gecikmesini, StAR bağımsız steroidogenezin birkaç ay devam etmesi ile açıklamışlar ve adrenal glandlar lipidle dolduğu zaman adrenal yetmezliğin ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir.⁵⁶

StAR geninde mutasyonlar gösterilen konjenital lipid adrenal hiperplazili, genotipi 46XX olan 3 hastada pubertenin spontan başlaması, LHRH'ye pubertal LH yanıtı alınması ve menapozal hormonlara östrojen yanıtının alınması; overlerde StAR'dan bağımsız bir sistemle mitokondriye kolesterol transport edildiğini göstermiştir.⁵⁷ Bu hastalarda menstrüel siklus hayat boyu devam ettiği halde ovülasyon olmamıştır.⁵⁷

Sonuç olarak adrenal hiperplazi genetiğine yönelik yapılan çalışmalar; enzimlere ait genlerdeki mutasyon tipleri, yeni mutasyonlar, hibrid genler, mutasyonların sıklık ve yaygınlığı, fenotip-genotip uyumu, invitro ekspresyon çalışmalarıyla substrat-fonksiyon ilişkisi, doğru ve güvenilir moleküler tanı için geliştirilen analiz metotları üzerinde yoğunlaşmıştır.

KAYNAKLAR

1. Donohoue PA, Parker KL, Migeon CL. Congenital Adrenal Hyperplasia. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, 8th ed. New York: McGraw-Hill; 2001. p.4097-106.
2. Miller WL. The Adrenal Cortex. In: Sperling MA, editor. Pediatric Endocrinology, 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2002. p.386-406.
3. Lobato MN, Ordonez-Sanchez ML, Tusie-Luna MT, Meseguer A. Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. Hum Hered 1999;49(3):169-75.
4. Mathur R, Menon PS, Kabra M, Goyal RK, Verma IC. Molecular characterization of mutations in Indian children with congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency. J Pediatr Endocrinol Metab 2001;14(1):27-35.
5. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. Clin Endocrinol 2000;53(1):117-25.
6. Lobato MN, Aledo R, Meseguer A. High variability of CYP21 gene rearrangements in Spanish patients with classic form of congenital adrenal hyperplasia. Hum Hered 1998;48(4):216-25.
7. Olney RC, Mougey EB, Wang J, Shulman DI, Sylvester JE. Using real-time, quantitative PCR for rapid genotyping of the steroid 21-hydroxylase gene in a north Florida population. J Clin Endocrinol Metab 2002;87(2):735-41.
8. Dracopoulou-Vabouli M, Maniati-Christidi M, Dacou-Voutetakis C. The spectrum of molecular defects of CYP21 gene in the Hellenic population: variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(6):2845-8.
9. Osinovskaia NS, Ivashchenko TE, Soboleva EL, Baranov VS, Potin VV, Plotikova EV. Analysis of the spectra of mutational damage of the 21-hydroxylase gene in patients with adreno genital syndrome. Genetika 2000;36(8):1147-9.
10. Fardella CE, Poggi H, Soto J, et al. Mutations in the CYP21 B gene in a Chilean population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. J Endocrinol Invest 2000; 23(6):412-6.
11. Delague V, Souraty N, et al. Mutational analysis in Lebanese patients with congenital adrenal hyperplasia due to a deficit in 21-hydroxylase. Horm Res 2000;53(2):77-82.
12. Lai CC, Tsai CH, Tsai FJ, Lee CC, Lin WD. Rapid monitoring assay of congenital adrenal hyperplasia with microbore high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry from dried blood spots. Rapid Commun Mass Spectrom 2001;15(22):2145-51.
13. Loke KY, Lee YS, Lee WW, Poh LK. Molecular analysis of CYP-21 mutations for congenital adrenal hyperplasia in Singapore. Horm Res 2001;55(4):179-84.
14. Labarta JI, Ezquieta B, Bello E, Calvo T, Mayayo E, Longas AF. Molecular characterization of 21 hydroxylase congenital adrenal hyperplasia (CAH) in a Spanish population. Pediatric Research (abstracts issue) 2001;49:113A.
15. Dain LB, Buzzalino ND, Oneto A, et al. Classical and nonclassical 21-hydroxylase deficiency: a molecular study of Argentine patients. Clin Endocrinol 2002;56(2):239-45.

16. 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;71(3):527-34.
17. Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(3):1059-65.
18. Dracopoulou M, Maniatis M, Dacou-Voutetakis C. Variable concordance between genotype and phenotype in the different forms of CAH caused by 21 hydroxylase deficiency. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:116A.
19. Chin D, Speiser PW, Imperato-McGinley J, Dixit N, Uli N, David R, Oberfield SE. Study of a kindred with classic congenital adrenal hyperplasia: diagnostic challenge due to phenotypic variance. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(6):1940-5.
20. Lee HH, Chang JG, Tsai CH, Tsai FJ, Chao HT, Chung B. Analysis of the chimeric CYP21P/CYP21 gene in steroid 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem* 2000;6(5):606-11.
21. Tardy V, Pinto G, Forest M, Morel Y. Phenotypic variation of P30L mutation could be explained by its association with a new 5' gene conversion of CYP21 gene to CYP21P. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:11A.
22. Tsai CH, Lin WD, Tsai FJ, Peng CT, Wu JY. Pitfalls of PCR-based genotyping in patients with 21-hydroxylase deficiency. *Acta Paediatr Taiwan*. 2001;42(3):145-50.
23. Lee HH, de Wija IJ, Sistermans EA. Use of TaqI digestion may lead to incorrect molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Metab* 2000;70(4):322-4.
24. Tajima T, Fujieda K, Mikami A, Igarashi Y, Nakae J, Cutler GB Jr. Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by the modified polymerase chain reaction to detect splice site mutation in the CYP21 gene. *Endocr J* 1998;45(3):291-5.
25. Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J. Reverse dot-blot hybridization as an improved tool for the molecular diagnosis of point mutations in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency. *Mol Diagn* 2001;6(3):193-9.
26. Pinterova L, Garami M, Pribilincova Z, et al. PCR based diagnosis of 21-hydroxylase gene defects in Slovak patients with congenital adrenal hyperplasia. *Endocr Regul* 2000;34(2):65-72.
27. Lee YH, Park ES, Kang SH, Kim H, Lee JY, Lee JS. Characterization of a novel DNA polymorphism in the human CYP21 gene and application for DNA diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol* 2000;53(4):419-22.
28. Witchel SF, Smith R, Crivellaro CE, et al. CYP21 mutations in Brazilian patients with 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet* 2000;106(4):414-9.
29. Wei WL, Killeen AA. Analysis of four common salt-wasting mutations in CYP21 (steroid-hydroxylase) by cleavage fragment length polymorphism analysis and characterization of a frequent polymorphism in intron 6. *Mol Diagn* 1998; 3(3):171-77.
30. Lee H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia. *Clin Genet*. 2001;59(5):293-301.
31. Theodoropoulou M, Barta C, Szoke M, et al. Prenatal diagnosis of steroid 21-hydroxylase deficiency by allele-specific amplification. *Fetal Diagn Ther* 2001;16(4):237-40.
32. Bobba A, Marra E, Lattanzio P, Iolascon A, Giannattasio S. Characterization of the CYP21 gene 5' flanking region in patients affected by 21-Oh deficiency. *Hum Mutat* 2000;15(5):481.
33. L'Allemand D, Tardy V, Gruters A, Schnabel D, Krude H, Morel Y. How a patient homozygous for a 30-kb deletion of the C4-CYP 21 genomic region can have a nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4562-7.
34. Fourmaintraux A, Alessandri SL, Tardy V, Cartault F, Morel Y. The reunion mutation is a complex rearrangement of the CYP21 genes and associated with the 2/3 of classic forms of 21 hydroxylase deficiency in the Island. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:112A.
35. Mornet E, Gibrat JF. A 3D model of human P450c21: study of the putative effects of steroid 21-hydroxylase gene mutations. *Hum Genet* 2000;106:330-9.
36. Lau IF, Soardi FC, Lemos-Marini SH, Guerra Jr G Jr, Baptista MT, DeMello MP. H28+C insertion in the CYP21 gene: a novel frameshift mutation in a Brazilian patient with the classical form of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5877-80.
37. Bachega TAS, Billerbeck AEC, Madureira G, et al. Molecular study of 181 Brazilian patients with 21 hydroxylase deficiency: Identification of six new mutations. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:113A.
38. Koyama S, Toyoura T, Saisyo S, Shimozawa K. Genetic analysis of Japanese patients with 21 hydroxylase deficiency: Identification of a patient with a new mutation of homozygous deletion of adenine at codon 246 and patients without demonstrable mutations within the structural gene for CYP21. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:113A.
39. Loke KY, Mathur R, Lee YS, Seng K, Poh L. Two novel mutations of the CYP21 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:112A.
40. Lajic S, Robins T, Krone N, Schwarz HP, Wedell A. CYP21 mutations in simple virilization congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Med* 2001;79(10):581-6.
41. Baumgartner-Parzer SM, Schulze E, Waldhausl W, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Austria: identification of a novel missense mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4771-5.
42. Paperna TY, Gershoni-Baruch R, Badarneh K, Kasinetz L, Hochberg Z. Transition mutations in a hot spot of the CYP11 β 1 gene may define the scope of 11 β hydroxylase deficiency (11OHD) in an endemic population. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:119A.
43. DeMello MP, Penachioni SY, DeCastro M, Bachega TASS, Mendonca BB. A novel mutation (6267S) on the CYP11 β 1 gene in a patient with 11 β hydroxylase deficiency causing complete virilization. *Pediatric Research* 2001;49:119A.

44. Chabre O, Partrat-Doyen S, Vivier J, Moral Y, Defaye G. Two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1 in congenital adrenal hyperplasia due to 11beta-hydroxylase deficiency. *Endocr Res* 2000;26(4):797-801.
45. Chabre O, Partrat-Doyen S, Chaffajon P, et al. Bilateral laparoscopic adrenalectomy for congenital adrenal hyperplasia with severe hypertension, resulting from two novel mutations in splice donor sites of CYP11B1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(11):4060-8.
46. Gillis D, Speiser P, Zhou Z, Rosler A. Combined 21-hydroxylase and 11beta-hydroxylase deficiency: patients report and molecular basis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(7):945-9.
47. Hampf M, Dao NT, Hoan NT, Bernhardt R. Unequal crossing-over between aldosterone synthase and 11beta-hydroxylase genes causes congenital hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4445-52.
48. Portrat S, Mulatero P, Curnow KM, Chaussain JL, Morel Y, Pascoe L. Deletion hybrid genes, due to unequal crossing over between CYP11B1 (11beta-hydroxylase) and CYP11B2 (aldosterone synthase) cause steroid 11beta-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(7):3197-201.
49. Lemos-Marini SHV, Soardi FC, Guerra G, Baptista MTM, Surur CRC, DeMello MP. Congenital adrenal hyperplasia due to 3 β HSD deficiency; case report in a Brazilian Bay. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:120A.
50. Marui S, Torrealba IM, Russell AJ, Latronico AC, Sutcliffe RG, Mendonca BB. A novel homozygous nonsense mutations E135* in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a girl with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *Hum Mutat* 1998;12(2):139.
51. Di Cerbo A, Biason-Lauber A, Savino M, et al. Combined 17alpha-hydroxylase/17, 20-lyase deficiency caused by Phe93Cys mutation in CYP17 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(2):898-905.
52. Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Furukawa K, Koshida H, Miyamori I, Mabuchi H. Genetic analysis of the cytochrome P-450c17alpha (CYP17) and aldosterone synthase (CYP11B2) in Japanese patients with 17alpha-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol* 2001;54(6):751-8.
53. Katsumata N, Ohtake M, Hojo T, Ogawa E, Hara T, Sato N, Tanaka T. Compound heterozygous mutations in the CYP11A gene cause congenital adrenal insufficiency. *Pediatric Research* 2001;49:11A.
54. Christenson LK, Strauss JF 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein: an update on its regulation and mechanism of action. *Arch Med Res* 2001;32(6):576-86.
55. Achermann JC, Meeks JJ, Jeffs B, et al. Molecular and structural analysis of two novel StAR mutations in patients with lipid congenital adrenal hyperplasia. *Mol Genet Metab* 2001;73(4):354-7.
56. Maret A, Portat-Doyen S, Mullis PE, Leheup B, Theintz GE, Morel Y. A novel mutation L260P in the steroidogenic acute regulatory protein gene in 3 unrelated patients with congenital lipid adrenal hyperplasia and Swiss ancestry. *Pediatric Research (abstracts issue)* 2001;49:120A.
57. Tanae A, Katsumata N, Sato N, Horikawa R, Tanaka T. Genetic and endocrinological evaluations of three 46,XX patients with congenital lipid adrenal hyperplasia previously reported as having presented spontaneous puberty. *Endocr J* 2000;47(5):629-34.