Molekularno genetička analiza mutacija AR gena kod pacijenata sa sindromom potpune neosjetljivosti na androgene

Lekić, Ivan

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:435065

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijske dijagnostike

IVAN LEKIĆ

MOLEKULARNO GENETIČKA ANALIZA MUTACIJA AR GENA KOD PACIJENATA SA SINDROMOM POTPUNE NEOSJETLJIVOSTI NA ANDROGENE

Završni rad

Osijek, 2016.

Rad je izrađen u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jasenka Wagner

Rad ima …..

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Jasenki Wagner, spec. med. biokemije i lab. medicine na potpori tijekom studiranja i izradi završnog rada, na stručnoj pomoći tijekom pisanja završnog rada.

Zahvaljujem predsjednici katedre prof. dr. sc. Mariji Heffer, dr. med na savjetima i podršci tijekom studiranja i izradi završnog rada.

Zahvaljujem Ivani Škrlec, dipl. ing. mol. biologije, na savjetima i razumijevanju tijekom studiranja.

Zahvaljujem Saneli Štibi, bacc. lab. med. diagn., na savjetima i podučavanju rada u laboratoriju tijekom izrade završnog rada.

Zahvaljujem mojoj obitelji na moralnoj potpori i strpljenju tijekom studiranja.

KRATICE

DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
AR	Androgenski receptor
Xq	dugi krak X kromosoma
NTD	amino terminalna domena
AF-1	funkcija aktivacije 1
DBD	DNA vezujuća domena (engl. *DNA binding domain*)
LBD	ligand vezujuća domena (engl. *Ligand binding domain*)
CAIS	sindrom potpune neosjetljivosti na androgene (engl. *Complete androgen insensitivity syndrome*)
PAIS	sindrom djelomične neosjetljivosti na androgene (engl. *Partial androgen insensitivity syndrome*)
MAIS	sindrom blage neosjetljivosti na androgene (engl. *Mild androgen insensitivity syndrome*)
AF1a	funkcija aktivacije 1a
AF1b	funkcija aktivacije 1b
T	testosteron
H12	histon 12
H3	histon 3
DHT	dihidrotestosteron
NR3C	nuklearni receptor 3-ketosteroid
Hsp90	(engl. *Heat shock protein 90*)
HMGB	protein visoke mobilnosti (engl. *High mobility group box*)
AF-2	funkcija aktivacije 2

NF-Kb	nuklearni faktor kappa lagani lanačani pojačivač aktiviranih B stanica (engl. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
STAT	signalni provoditelj i aktivator transkripcije (engl. *The signal transducer and activator of transription*)
IGF -1	inzulinu sličan faktor rasta (engl. *Insulin like growth factor*)
Insl3	inzulinu sličan čimbenik 3 (engl. *Insulin-like factor 3*)
MIS	čimbenik koji inhibira razvoj Müllerovih kanala
SRY	gen *SRY*, gen na Y kromosomu koji određuje spol (engl. *Sex-determining Region*)
Pl-T	plazmatski testosteron
LH	luteinizirajući hormon
AIS	sindrom neosjetljivosti na androgene (engl. *Androgen insensitivity syndrome*)
hCG	humani korionski gonadotropin
FSH	folikul stimulirajući hormon
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
PCR	lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase chain reaction*)
pb	parova baza
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfat (engl. *Deoxyribonucleotide triphosphat*)
dATP	deoksiadenozin trifosfat (engl. *Deoxyadenosin triphosphate*)
dGTP	deoksigvanozin trifosfat (engl. *Deoxyguanosine triphosphate*)
dTTP	deoksitimidin trifosfat (engl. *Deoxythymidine triphosphate*)
dCTP	deoksicitidin trifosfat (engl. *Deoxycytidine triphosphate*)
TBE	pufer (tris(hidroksimetil)aminometan)
UV	ultra ljubičasto svjetlo
BPB	brom fenol plava boja (engl. *brom phenol blue*)

KM	kontrola muška
KF	kontrola ženska
pGEM	komercijalni DNA marker za elektroforezu
Phix174	komercijalni DNA marker za elektroforezu

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. X KROMOSOM 1
1.2. *AR* GEN 2
1.3. ANDROGENSKI RECEPTOR 4
1.4. DIFERENCIRANJE SPOLA 5
1.5. SINDROM POTPUNE NEOSJETLJIVOSTI NA ANDROGENE (CAIS) 7
2. CILJ RADA 10
3. ISPITANICI I METODE 11
3.1. Ispitanici 11
3.2. Metode 12
3.2.1. Izolacija DNA uporabom Qiagen kompleta reagensa 12
3.2.2. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerizacije (PCR) 14
3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu 16
4. REZULTATI 18
5. RASPRAVA 28
6. ZAKLJUČAK 31
7. SAŽETAK 32
8. SUMMARY 33
9. LITERATURA 34
10. ŽIVOTOPIS 36

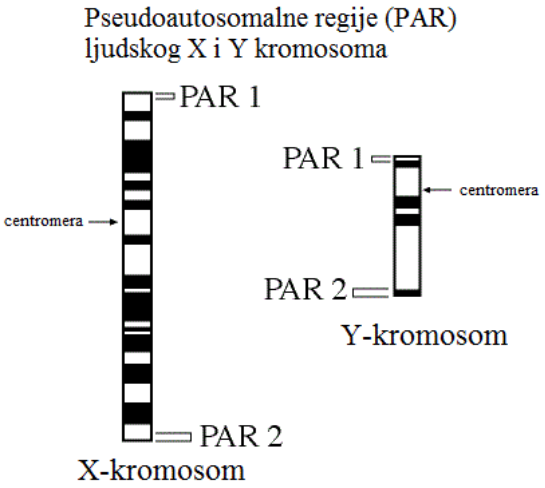
1. UVOD

1.1. X KROMOSOM

X kromosom je jedan od dva spolna kromosoma u ljudi (drugi je Y kromosom). Spolni kromosomi čine jedan od 23 para ljudskih kromosoma u svakoj stanici. X kromosom sadrži oko 155 milijuna nukleotida koji predstavljaju oko 5% ukupnog DNA u stanici.

Svaka osoba normalno ima jedan par spolnih kromosoma u svakoj stanici. Žene imaju dva X kromosoma, dok muškarci imaju jedan X i jedan Y kromosom. Rano u embriološkom razvoju kod žena, jedan X kromosom se nasumično i trajno metilira te na taj način samo jedan X kromosom bude aktivan. Ovaj se fenomen naziva X-inaktivacija ili lionizacija. X-inaktivacija osigurava ženama, da kao i muškarci, imaju jedan aktivan X kromosom u svakoj stanici u tijelu. Iz razloga što je inaktivacija nasumična u zdravih žena X kromosom, koji se naslijedio od majke, aktivan je u jednom dijelu tjelesnih stanica, a X kromosom koji se naslijedio od oca aktivan je u drugom dijelu tjelesnih stanica.

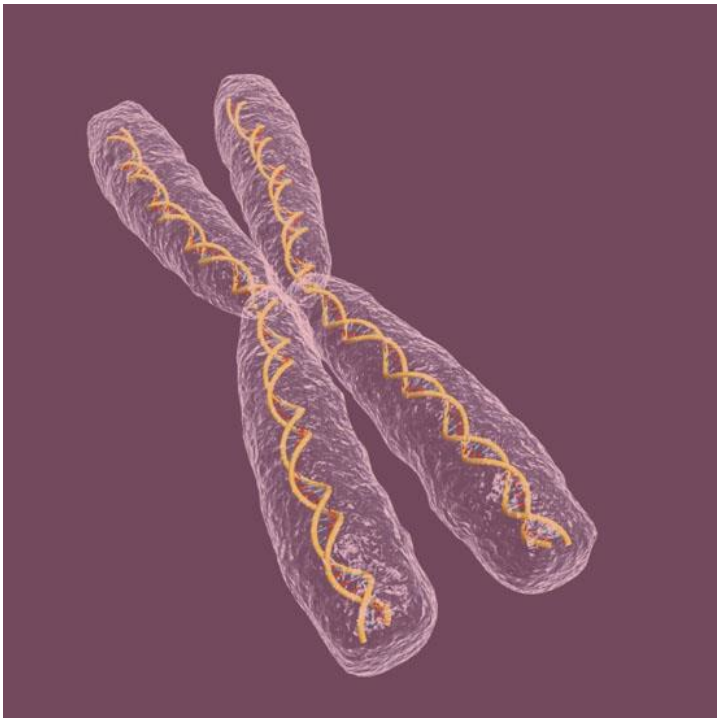
Neki geni na X kromosomu izbjegavaju X-inaktivaciju. Mnogi geni koji izbjegavaju inaktivaciju nalaze se na krajevima krakova X kromosoma u regijama koje su poznate kao pseudo-autosomalne regije. Iako je puno gena jedinstveno za X kromosom, geni u pseudo-autosomalnim regijama nalaze se i na X i Y kromosomu. Kao rezultat toga i žene i muškarci imaju dvije funkcionalne kopije takvih gena. Puno gena u pseudo-autosomalnim regijama su esencijalni za normalni embrionalni razvoj.



Slika 1. Prikaz pseudoautosomalnih regija na X i Y kromosomu čovjeka

Izvor: http://web.pdx.edu/~newmanl/Pseudoautosomal%20X-Y.gif

X kromosom sadrži od 800 do 900 gena koji sadrže uputu za sintezu proteina. Ti proteini imaju raznoliku ulogu u tijelu čovjeka (1,2).



Slika 2. Prikaz ljudskog X kromosoma

Izvor: http://blog.medisin.ntnu.no/wp-content/uploads/2014/03/x_kromosom_iStock.jpg

1.2. *AR* GEN

Androgen receptorski (*AR*) gen nalazi se na X kromosomu čija je citogenetička lokacija Xq12 (dugi (q) krak X kromosoma na poziciji 12). AR pripada super-obitelji jezgrinih receptora. Egzon 1 (NTD) igra važnu i specifičnu ulogu u aktivnosti AR proteina. Kodira transaktivacijsku domenu i rekrutira većinu AR koregulatora. Egzon 1 je vrlo dugačka domena *AR* gena (više od 50% proteina) sa polimorfizmom dvije ponavljajuće regije: CAG ponavljanja koja normalno variraju od 11-31 ponavljanja i CGN ponavljanja koja variraju od 10-25 ponavljanja.

Ove varijacije u dužini polimorfizama reguliraju AR aktivnost (3,4). Egzon 1 sadržava AF-1 regiju i dimerizacijske zone koje sudjeluju u AR transaktivaciji i potiču njegovu dimerizaciju. Unatoč velikoj dužini i važnoj ulozi u AR aktivnosti, nekoliko mutacija u egzonu 1 su zabilježene. Samo 15% mutacija u *AR* genu nalaze se na egzonu 1, za razliku od ostalih

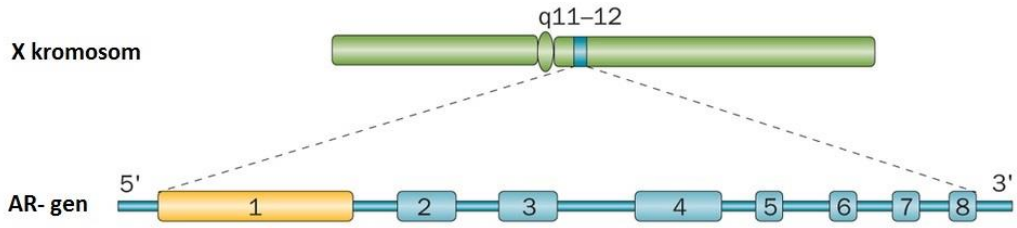
egzona koji akumuliraju i preko 50% mutacija u *AR* genu. Baza podataka mutacija *AR* gena pokazuje da je identificirano više od 300 mutacija. Oko 85% ovih mutacija lokalizirano je u egzonu 2 do egzona 8.

U ovim mutacijama 20% je lokalizirano u DBD regijama (egzon 2 i 3), a 65% je lokalizirano u LBD regiji (egzon 4-8). Samo su 51 mutacija lokalizirane u egzonu 1 (transaktivacijskoj domeni), iako ovaj egzon kodira više od polovice AR proteina. Od mutacija unutar egzona 1, 36 (70%) mutacija uzrokuju CAIS, 7 (14%) uzrokuju PAIS, a 8 (16%) mutacija uzrokuje MAIS (uglavnom neplodnost). Egzon 1 je važna regulatorna regija u aktivnosti AR. Ovaj egzon kodira N-terminalnu domenu AR proteina koji sadrži transaktivacijske elemente (AF1a i AF1b), dimerizacijske zone, nekoliko mjesta vezanja za kofaktore i dvije regije uključene u N-terminalnu i C-terminalnu domensku interakciju.

Vezanje T dovodi do konformacijske promjene H12 heliksa (C-terminalni kraj) koji reagira sa H3 heliksom (N-terminalni kraj) i inducira interakciju kofaktora. Gubitak ove regije domene uzrokuje inaktivaciju AR (3). Većina egzon 1 mutacija je povezano s CAIS-om. Sve novo identificirane mutacije dovode do preuranjenog stop kodona, povećavajući postotak preranih stop kodon mutacija u egzonu 1 za 25%. Ove mutacije ometaju AR transduciranu aktivnost jer je protein izgubio svoju prostornu orijentaciju. Veliki postotak mutacija u egzonu 1 indiciraju važnu ulogu ovog egzona u funkcionalnoj aktivnosti AR. Viša frekvencija egzon 1 preuranjenih stop kodona uzrokuju CAIS. Interakcija testosterona i AR presudna je za razvoj struktura čije su podrijetlo Wolffovi kanali tijekom fetalnog razvoja. Dihidrotestosteron (DHT) s AR važan je za razvoj ispravne morfologije vanjskih muških spolnih organa. *AR* gen je dug više od 90 kb i kodira protein koji ima 3 velike funkcionalne jedinice: N-terminalnu domenu, DNA-vezujuću domenu, androgen vezujuću domenu. Protein funkcionira kao steroidni hormon, transkripcijski faktor. Nakon vezanja hormonskog liganda, receptor se odvaja od vezujućeg proteina, translocira se u nukleus, dimerizira i zatim stimulira transkripciju androgenog odgovarajućeg gena.

AR gen je gen za nuklearni hormonski receptor NR3C razreda, koji također uključuje mineralokortikoidne, progesteronske i glukokortikoidne receptore. Ova skupina hormonskih receptora je eksprimirana u koštanoj srži, mliječnim žlijezdama, prostati, testisima i mišićnom tkivu, gdje postoje kao dimerizirani parovi Hsp90 i HMGB proteina (5,6,7). *AR* gen pruža kalup za sintezu proteina AR. Androgeni hormoni (npr. testosteron) su važni za normalan seksualni razvoj muškarca prije rođenja i tijekom puberteta. AR omogućuje tijelu normalni odgovor na ovu skupinu hormona. AR receptori su prisutni u mnogim tkivima tijela, u kojima

vežu androgene. Nastali androgen – AR kompleks se veže na DNA i regulira aktivnost androgen odgovarajućih gena (7).

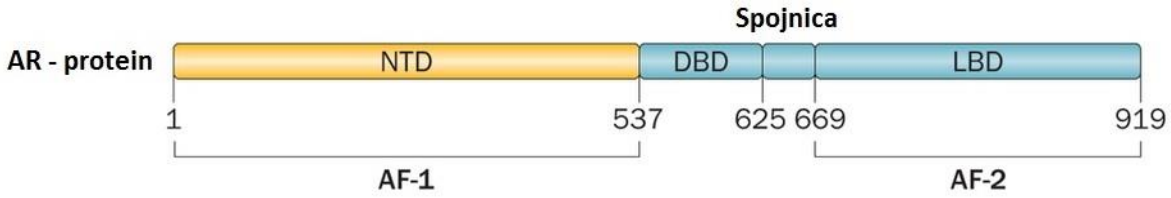


Slika 3. Shematski prikaz smještaja *AR* gena na ljudskom X kromosomu

Izvor: http://www.nature.com/nrurol/journal/v12/n1/images/nrurol.2014.345-f1.jpg

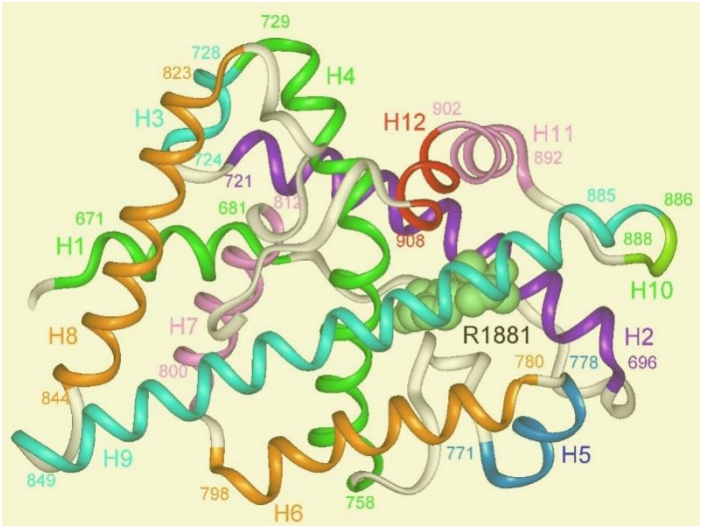
1.3. ANDROGENSKI RECEPTOR

AR je nuklearni receptor koji igra važnu ulogu u spolnoj diferencijaciji. Ovaj transkripcijski faktor je organiziran u tri glavne domene: N-terminalnu domenu (NTD) koja je kodirana na egzonu 1 (transaktivacijska domena na koju se veže najveći broj AR kofaktora); centralno vezujuća DNA domena (DBD) koja je kodirana na egzonima 2 i 3 i C-terminalnu ligand vezajuću domenu (LBD) kodiranu na egzonima 4-8 (odgovorna za vezanje androgena i kofaktora koji sadrže ligand-ovisnu transaktivacijsku domenu (AF-2). Androgenski receptori djeluju na gensku ekspresiju preko interakcije s transkripcijskim faktorima uključujući AF-1, NF-kappaB i STAT. Ciljni geni androgenskih receptora uključuju inzulinu sličan faktor rasta (IGF-1) i gene zadužene za razvoj primarnih i sekundarnih muških spolnih karakteristika te održavanje spolne funkcije (5). AR djelujući na principu prekidača koji uključuje ili isključuje aktivnost gena utječe na razvitak muških spolnih karakteristika. Receptor nema samo funkciju uspostavljanja muškog fenotipa već i njegova održavanja, što se manifestira održavanjem spermatogeneze i kontinuiranim prilagodbama odraslog muškog fenotipa životnim prilikama (rasporedom mišićne mase, raspodjelom rezervnih masnoća, dlakavošću lica i tjemena itd.). Androgeni i AR također imaju i druge važne funkcije u muškaraca i u žena, kao što su reguliranje rasta dlaka i seksualni nagon (6,7).



Slika 4. Prikaz ljudskoga AR proteina (AR receptora)

Izvor: http://www.nature.com/nrurol/journal/v12/n1/images/nrurol.2014.345-f1.jpg



Slika 5. Prostorni prikaz ljudskoga AR proteina (AR receptora)

Izvor: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/40/2AM9.png/250px-2AM9.png

1.4. DIFERENCIRANJE SPOLA

Prvi je dio razvoja spolnih organa bipotencijalan pa sve do 7. tjedna razvoja embrija ne možemo govoriti o fenotipskom spolu. Urogenitalni nabor ventralno je zadebljanje primitivnog mezonefrosa koji se formira tijekom 4. tjedna razvoja embrija, a u kojega iz žumanjčane vreće migriraju primordijalne germinativne stanice tijekom 6. tjedna razvoja. Spolna diferencijacija gonada počinje tek u sedmom tjednu kad u urogenitalne nabore dospiju germinativne stanice, iako one same po sebi nisu čimbenik diferencijacije spola.

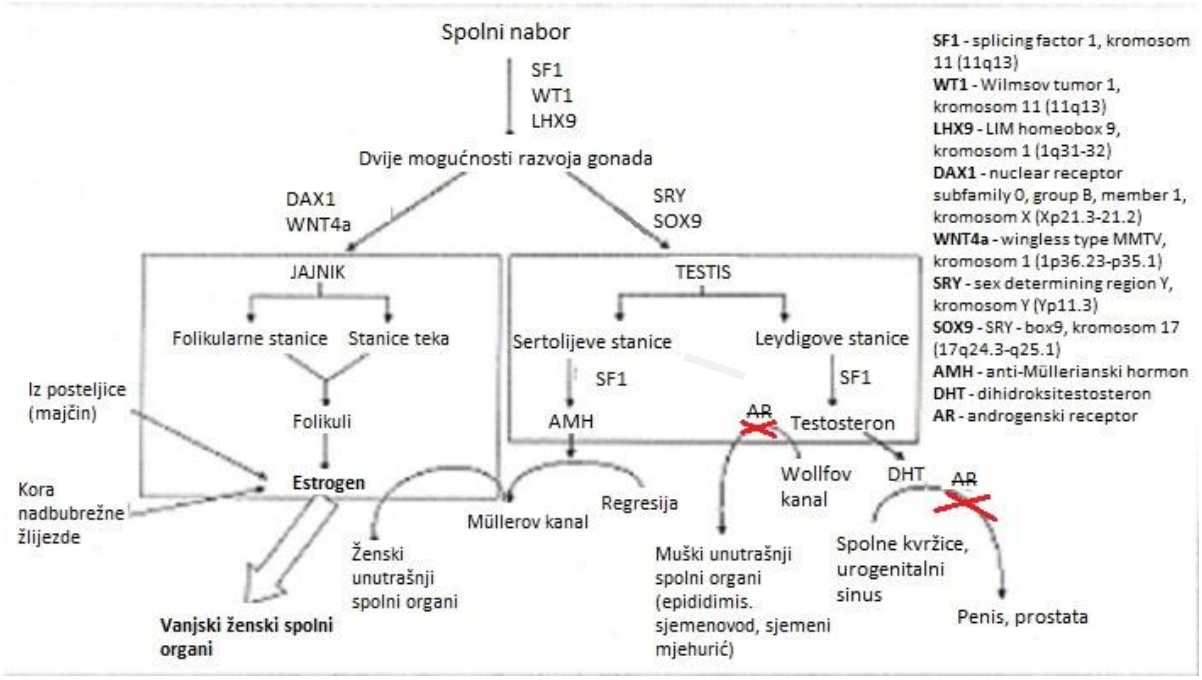
Germinativne stanice odmah po prispijeću u testis budu okružene pre-Sertolijevim stanicama koje tamo dospijevaju vjerojatno iz obližnjeg mezonefrosa. Od tih dviju vrsta stanica formiraju se spolni tračci tijekom 7. tjedna razvoja. Za razliku od spolnih tračaka jajnika u kojima su germinativne stanice potaknute na mejozu, spolni tračci testisa luče inhibitor mejoze koji zaustavlja mejozu do puberteta.

Od 8. tjedna razvoja, Sertolijeve stanice luče MIS, glikoprotein iz TGF-β obitelji, koji se veže na receptor na Müllerovim kanalima i dovodi do njihove regresije. One će nastaviti lučiti MIS sve do puberteta. Slijedeća su važna vrsta sekretornih stanica testisa Leydigove stanice, koje se diferenciraju iz intersticijskih stanica mezenhima koji razdvaja sjemene (spolne) tračke. One počinju lučiti testosteron već tijekom 9. tjedna razvoja kada se on veže na AR Wolffovih kanala i stabilizira njihov razvoj u vas deferens, epididimis i seminalne vezikule. Lučenje testosterona traje koliko i aktivnost gonadotropina, do 3. ili 6. postnatalnog mjeseca, kada se potpuno utišava sve do puberteta.

Testis u CAIS-u hormonalno je normalno aktivan te luči MIS i testosteron. Posljedica je toga regresija Müllerovih kanala, ali nema stabilizacije Wolffovih kanala jer defektan AR ne veže testosteron. Zato izostaje razvoj svih struktura bilo porijekla Müllerovih ili Wolffovih kanala. Za razvoj vanjskih muških spolnih organa nije bitan testosteron, već dihidrotestosteron (DHT) koji se također veže na AR. Kako je to isti receptor koji nije obavio svoju funkciju prilikom razvoja Wolffovih kanala, on u većini slučajeva nema veći afinitet ni za DHT pa ne dolazi do razvoja muškoga vanjskoga spolovila u CAIS-u.

U spuštanju testisa sudjeluju dva signalna puta: jedan, koji ovisi o androgenima i nadgleda transabdominalnu migraciju; te drugi, kojega regulira inzulinu sličan čimbenik 3 (Insl3, engl. *Insulin like factor 3*), a koji je zadužen za ingvinalno-skrotalno spuštanje. Nedostatak AR, ali i mutacije receptora za Insl3 dovode do kriptorhizma, odnosno zaostajanja testisa u abdomenu ili ingvinalnom kanalu kod djevojčica s CAIS-om.

Početkom puberteta, interminentna, u početku noćna sekrecija gonadotropina stimulira gonade na ponovnu sekreciju testosterona, koji sada ima zadatak potaknuti spermatogenezu i izazvati virilizaciju tijela (tipično muška raspodjela dlakavosti po tijelu i licu, preraspodjela mišićne mase i masnoga tkiva, inhibicija rasta grudi). Sertolijeve stanice, koje tijekom fetalnoga razvoja i djetinjstva, nisu imale AR, sada ga eksprimiraju i odgovaraju na testosteronsku stimulaciju sazrijevanjem i prestankom lučenja MIS-a što kod CAIS-a izostaje pa nema niti znakova pubertetske virilizacije (8).



Slika 6. Shematski prikaz razvoja spolnih organa s mjestima zastoja u CAIS-u.

1.5. SINDROM POTPUNE NEOSJETLJIVOSTI NA ANDROGENE (CAIS)

Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene (CAIS) je najteža manifestacija neosjetljivosti na androgene, koja se manifestira kao ženski fenotip, a pojavljuje se na 0.12/1000 živorođenih djevojčica. Mutacije gena *AR* u 1/3 pacijenata nastaju de novo, a u druge 2/3 prenesene su naslijeđem s majke na dijete. Nasljeđuje se X vezano recesivno (8). U klasičnom CAIS-u, pacijenti su karakterizirani s: normalnim ženskim vanjskim genitalijama, bilateralnim unutar-abdominalnim ili ingvinalnim testisima, normalnim razvojem dojki, nedostatkom ili malim brojem pubičnih dlaka, hipoplastičnim ili nedostatkom Wolffovih struktura povezanih sa normalnim ili povišenim vrijednostima testosterona u plazmi (pl-T) i visokim vrijednostima luteinizirajućeg hormona (LH), kariotipom 46,XY.

Procjenjuje se da su za 28% 46,XY pacijentica s normalnim ili povišenim pl-T odgovorne mutacije u *AR* (5). U potpunoj formi (CAIS), poremećaj je karakteriziran prepoznatljivim ženskim fenotipom, nedostatkom Müllerovih struktura; bilateralnim, ingvinalnim ili unutar-abdominalnim testisima, koji sintetiziraju androgene u normalnim vrijednostima. Molekularna baza CAIS-a je mutacija u *AR* genu.

Unutar više od 100 opisanih mutacija pacijenata s CAIS-om, većina mutacija čine točkaste mutacije (supstitucija jedne baze u DNA slijedu) koje uzrokuju preuranjenu pojavu stop kodona (9).

U usporedbi s točkastim mutacijama, delecija većeg broja parova baza u DNA slijedu su izuzetno rijetke i one uzrokuju molekularni defekt CAIS-a (6). Žene s CAIS-om imaju fizičke i psihološke faktore koji mogu ukazivati ili utjecati na njihovu seksualnu funkciju i zadovoljenost (vagine kraće od prosjeka, nesposobnost na reakciju na androgene, anksioznost ili zabrinutost zbog njihovog stanja koji može uzrokovati probleme s njihovim samopouzdanjem, slikom o svojemu tijelu, senzualnosti ili seksualnoj funkciji. Seksualna disfunkcija je česta u pacijentica s CAIS-om, uglavnom je to zbog problema u vaginalnoj penetraciji, neučestaloj ili nepostojećoj komunikaciji (10,11,12).

Vrijednosti serumskog gonadotropina i testosterona se često mjere kada se sumnja na AIS (sindrom neosjetljivosti na androgene). Dijagnoza AIS-a zahtijeva precizno isključivanje defekta u biosintezi T i u metabolizmu nastajanja DHT-a iz T. Vrijednosti ispod normalne granice hCG stimulatora testosterona, ne isključuje nužno AIS. Bazalne vrijednosti LH, ali ne i one FSH su često iznad normalne vrijednosti. Razine testosterona su ili normalne ili blago povišene.

Razine FSH su normalne, dok su razine T kod žena s CAIS-om i abdominalnim testisima niske (13). Dijagnoza CAIS-a temelji se na kliničkoj slici, ultrazvuku (UZV) ili nuklearnoj magnetnoj rezonanci (NMR) male zdjelice, ginekološkom, endokrinološkom i citogenetičkom nalazu. Danas je uvriježeno u dijagnostičke svrhe tražiti kariogram iz limfocita periferne krvi, te fluorescentna in situ hibridizacija (FISH, eng. Fluorescent In Situ Hybridization) sa SRY sondom. Na taj se način u pozitivnim slučajevima ustanovljava 46,XY kariotip i prisutnost signala na Y kromosomu sa FISH SRY sondom. Krajnji je dokaz za CAIS pronalaženje mutacije sekvenciranjem gena *AR*. Otkada je dostupna prenatalna dijagnostika, sindrom je moguće dijagnosticirati u drugom tromjesečju trudnoće. Otkriva se kao nepoklapanje između spola utvrđenog 3D ultrazvukom čeda i spolnih kromosoma ustanovljenih nakon kultivacije stanica plodove vode. Kako se radi o zdravom čedu ženskoga spola, to nije i medicinska indikacija za pobačaj. Prilikom uzimanja obiteljske anamneze treba obratiti pozornost na majčinu lozu, jer se CAIS nasljeđuje X-vezano recesivno, te na srodstvo i neplodne članove obitelji (8).

Najčešći terapijski postupak u pacijenata s CAIS-om jest rješavanje ingvinalne hernije koja je i jedan on načina otkrivanja toga sindroma. Kako pacijenti kojima su očuvane gonade imaju priliku doživjeti prirodni pubertet, u slučaju pronalaženja gonada u ingvinalnom kanalu u dječjoj dobi, one mogu biti smještene u abdomen do kraja puberteta. U svih pacijenata s poremećajem razvoja spola, a posebno onih s težim zastojem diferencijacije gonada, postoji povećani rizik razvoja tumora gonada. U slučajevima neosjetljivosti na androgene česti su seminomi koji počinju kao in situ neoplazije intratubularnih germinativnih stanica. Ako je gonadektomija u djetinjstvu ipak učinjena zbog karcinoma in situ, pubertet se inicira malim dozama etil-estradiola (2 μg na dan) u dobi od 10-11 godina. Zamjenska oralna terapija doseže doze od 20 μg na dan do 15. godine života, a to je i terapija održavanja koja se može dalje primjenjivati i transdermalnim preparatima. Ta je terapija jako važna i radi prevencije osteoporoze. Vaginoplastika je još jedan kirurški zahvat koji je ponekad potreban, ali se može izbjeći u blažim slučajevima. Vagina je obično duga oko 2.5 – 3 cm i završava slijepo. Stanje se u dječjoj dobi ustanovljava rektalnim pregledom pod anestezijom.

Danas se smatra da nikakav zahvat nije potreban do pred kraj puberteta jer je za psihu pacijentice povoljnije sve zahvate učiniti onda kad ih je ona u stanju sama nesmetano i bez inzistiranja roditelja zatražiti (8). Kako se radi o spolno vezanoj recesivnoj bolesti, kod ostale ženske djece iz te obitelji postoji rizik da također imaju CAIS ili da su prenosioci toga sindroma. Fenotipski dječaci uvijek su i genotipski dječaci te ne prenose sindrom. Roditelje često zanima kako će se taj sindrom odraziti na spolnu identifikaciju djeteta koje ga nosi. Spolna identifikacija mentalni je proces koji nije uvijek neposredno ovisan o gonadnom spolu. Znatno prije embrionalnoga formiranja gonada eksprimiraju se spolno specifični geni u spolno dismorfičnim jezgrama mozga, a uspostavljena razlika u izgledu specifičnih regija podložna je hormonalnim utjecajima.

U djevojčica s CAIS-om radi se o potpunoj identifikaciji sa ženskim spolom. Sama identifikacija s nekim spolom nije predskazatelj odabira heteroseksualnoga partnera, no kod tih pacijentica nije primijećena nimalo veća pojava biseksualnosti ili homoseksualnosti, no u ostaloj populaciji. Od svih poremećaja razvoja spola, pacijentice s CAIS-om imaju najviši postotak identifikacije sa svojim spolom, najmanji postotak depresije i anksioznosti, često su u dugogodišnjim stabilnim vezama ili u njih i ne ulaze zbog psihološkog opterećenja kojeg osjećaju zbog nemogućnosti da rode vlastitu djecu (8).

2. CILJ RADA

Ciljevi istraživanja su:

- utvrditi postoji li kod naših pacijentica sa klinički suspektnim sindromom potpune neosjetljivosti na androgene neka od 5 najčešćih mutacija u *AR* genu na X kromosomu

- procjena incidencije 5 najčešćih mutacija *AR* gena u našoj ispitivanoj skupini

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

U ovom radu ispitanici su žene upućene na obradu u KBC Osijek. Uzorci su prikupljeni iz banke uzoraka pri Laboratoriju za medicinsku genetiku, Medicinskog fakulteta u Osijek. Sve pacijentice su potpisale informirani pristanak i on se nalazi u arhivu Laboratorija. Prilikom primitka uzoraka u laboratorij, uzorci su šifrirani jedinstvenom laboratorijskom oznakom. Ukupan broj ispitanica bio je 9. Podaci o pacijenticama prikazani su u tablici 1 i 2.

Spol	Dob	Anamnestički podaci
Ženski	17 godina	Pacijentica rođena iz blizanačke trudnoće kao drugi blizanac. Upućena na daljnju obradu tijekom upisa u školu zbog niskog rasta.
Ženski	3 godine	Rođena iz normalne trudnoće. Razvoj u djetinjstvu normalan. Upućena liječniku zbog ingvinalne hernije.
Ženski	30 godina	Žena rođena iz normalne trudnoće na utvrđeni termin. Psihomotorni razvoj tijekom djetinjstva normalan. Dolazi liječniku zbog sumnje na nepotpunu testikularnu feminizaciju..
Ženski	25 godina	Rođena iz uredne trudnoće, razvoj u djetinjstvu normalan. Dolazi liječniku zbog izostajanja menstruacije.
Ženski	30 godina	Djevojka rođena iz normalne trudnoće, razvoj u djetinjstvu je normalan. Dolazi liječniku zbog izostajanja menstruacije.
Ženski	51 godina	Žena rođena u terminu iz normalne trudnoće. Dolazi liječniku zbog izostajanja menstruacije.
Ženski	rođeno: 2015 godine	Umrlo nakon poroda, malformacijski sindrom.
Ženski	17 godina	Rođena iz uredne trudnoće, porod u terminu. Redovito cijepljena. Razvoj u djetinjstvu je bio normalan. Dolazi liječniku zbog izostajanja menstruacije.
Ženski	16 godina	Rođena iz prve kontrolirane trudnoće, uredna tijeka. Porođaj je bio u terminu. Razvoj u djetinjstvu je bio normalan. Dolazi liječniku zbog izostajanja menstruacije.

Tablica 1. Anamnestički podaci o pacijenticama sa sumnjom na CAIS

Pacijent	Uputna dijagnoza	Dijagnostički testovi	Nalazi
Pacijentica 1	Turrnerov sindrom	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 2	Sumnja na testikularnu feminizaciju	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 3	Morrisov sindrom	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 4	Amenorrhoea primmaria, hipergonadotropni hipogonadizam	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 5	Amenorrhoea primmaria	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 6	Amenorrhoea primmaria	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 7	Malformacijski sindrom	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 8	Amenorrhoea primmaria	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan
Pacijentica 9	Amenorrhoea primmaria	Kariotipizacija, FISH na SRY	46,XY, SRY uredan

Tablica 2. Uputne dijagnoze i rezultati genetičkih testiranja kod pacijentica s CAIS

3.2. Metode

Uzorci su analizirani metodama koje se rutinski koriste u radu Laboratorija za medicinsku genetiku (izolacija DNA iz pune krvi, višestruka lančana reakcija polimerazom, horizontalna agarozna gel elektroforeza).

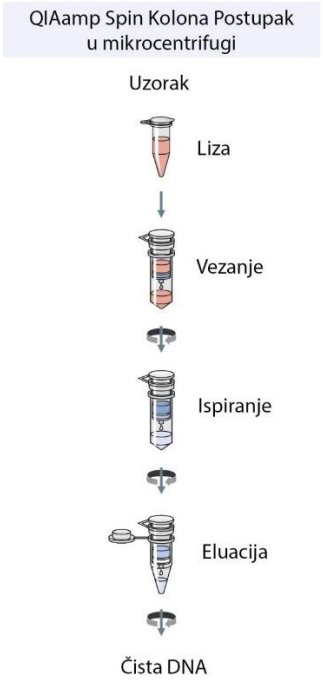
3.2.1. Izolacija DNA uporabom Qiagen kompleta reagensa

Izolacija DNA radi se prema protokolu proizvođača (*QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany*) na mini spin kolonama. U prvom koraku koristi se enzim koji neselektivno razgrađuje proteine (proteinaza K), AL pufer za liziranje stanica, uzorak pune krvi, te etanol koji služi za precipitaciju DNA. U posljednjem koraku koristi se pufer niske ionske

jakosti (potiče otpuštanje DNA s kolone). Tako dobivena DNA čuva se u AE puferu. Sva centrifugiranja se provode pri sobnoj temperaturi, dok se puferi AW1 i AW2 pripremaju prema uputama na bočicama.

Uzorak krvi uzet je u epruvetu s antikoagulansom etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA). Ukoliko se uzorci obrađuju odmah moraju biti sobne temperature, a ukoliko se pohranjuju tada ih se pohranjuje na temperaturu od -20°C.

U epruvetu od 1.5 ml dodano je 20 µl Proteinaze K, 200 µl ne koagulirane krvi i 200 µl AL pufera. Smjesa je inkubirana 10 minuta na 70˚C. Nakon inkubacije dodano je 200 µl etanola (96 % - 100 %). Smjesa je nanesena na Dneasy Mini spin kolonu i centrifugirana je jednu minutu na 8000 rpm. Dneasy Mini spin kolona stavljena je u novu 2 ml epruvetu (od 2 ml), a tubica s filtratom je odbačena. Dodano je 500 µl AW1 pufera, a zatim je centrifugirano jednu minutu na 8000 rpm. Nakon centrifugiranja, Dneasy Mini spin kolona je stavljena u novu 2 ml epruvetu (od 2 ml), a tubica s filtratom je odbačena. Dodano je 500 µl AW2 pufera i centrifugirano je 3 minute na 14000 rpm. Dneasy Mini spin kolona je stavljena u novu epruvetu i dodano je 100 µl AE pufera direktno na membranu, inkubirano je na sobnoj temperaturi pet minuta i centrifugirano je jednu minutu na 8000 rpm. DNA je čuvana u AE puferu na -20˚C. Količina DNA dobivena iz 200 µL pune krvi iznosi od 3 do 12 µg. Dobivena DNA je dvolančana, oslobođena je od proteina, nukleaza i ostalih kontaminacija i inhibitora (14).



Slika 7. QIAamp Spin Kolona Postupak u mikrocentrifugi, shema

3.2.2. Umnažanje DNA lančanom reakcijom polimerizacije (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) je metoda kojom se kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija, a temelji se na enzimskoj reakciji DNA polimeraze. PCR je brza, osjetljiva i specifična metoda. Godine 1983. Kary Mullis je otkrio i opisao metodu kojom se in vitro umnožava DNA bez kloniranja i to iz malih količina DNA. Za to otkriće 1993. Kary Mullis dobio je Nobelovu nagradu za kemiju. Od jedne kopije DNA dobije se nekoliko milijuna kopija (2^n kopija, gdje je "n" broj ciklusa reakcije). Da bi se određeni odsječak DNA umnožio potrebno je poznavati slijed nukleotida odsječka DNA koji se umnaža kako bi se mogle kreirati početnice (engl. primers).

Početnice su sintetizirane molekule DNA duljine 18 - 24 parova baza (pb). Koriste se dvije početnice koje će započeti sintezu u suprotnim smjerovima na dva komplementarna lanca DNA.

Denaturacija se odvija pri temperaturi od 94˚C, pritom se razdvajaju lanci dvostruke uzvojnice DNA kalupa te dolazi do denaturacije molekule DNA. Temperatura se snižava na 60˚C i dolazi do vezanja početnica na lance DNA-kalupa. DNA polimeraza tada sintetizira lanac DNA komplementaran kalupu početnica pri 72˚C. U jednom ciklusu umnažanja iz svake molekule kalupa nastaju po dvije identične molekule DNA. Reakcijska smjesa sadržava kalup DNA, par početnica, odgovarajući pufer za PCR, MgCl2, smjesu dNTP-a, (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) i termostabilnu Taq DNA polimerazu (15).

U svrhu utvrđivanja postojanja mutacija AR područja X kromosoma, analiziraju se odabrane mutacije koje su navedene u Tablici 2. Mutacije su odabrane na temelju njihove učestalosti u bazi mutacija za *AR* gen koje uzrokuju CAIS, a jedan od vodećih kriterija za izbor bila je njihova pojavnost na geografskom području centralne Europe (Datoteka: http://androgendb.mcgill.ca/)(16).

PCR reakcija izvodi se u reakcijskom volumenu od 15 µl: 2 µl DNA uzorka, 7.5 µl 2 x PCR Master mix, 1 µl 10µM primer mix, 4.5 µl deionizirana destilirana voda. Denaturacija se izvodi na 95˚C 15 minuta, slijedi 30 ciklusa: 94˚C 1 min, 60˚C 1 min 30 sek, 72˚ 1 min te završno produljenje lanaca tijekom 10 min na 72˚C. U svakoj PCR reakciji koriste se pozitivna i negativna kontrola. Kontrolni uzorci činili su zdrava muška i ženska osoba (osobe bez sindroma potpune neosjetljivosti na androgene) koje imaju medicinsku dokumentaciju koja isključuje CAIS.

Specifične početnice za analizu pet odabranih mutacija u AR genu navedene su u Tablici 3.

Mutacija	Sindrom	Patogenost	Referenca
c.244_248/p.(Thr82fs) (1359_1363)	CAIS	Nije dokazana kao samostalna mutacija. Ova mutacija uključena je u 27% slučajeva sa CAIS sindromom. Uzrokuje povećanje stop kodona za 25%. Mutacija je delecija te se očituje kao pomak čitanja i uzrokuje preuranjeni stop kodon u AR proteinu.	Philibert et al.Fertility and Sterility 94:472-276 2010
c.1041_1062/p.(Gly349fs) (2156_2177)	CAIS	Nije dokazana kao samostalna mutacija. Ova mutacija uključena je u 27% slučajeva sa CAIS sindromom. Uzrokuje povećanje stop kodona za 25%. Mutacija je delecija koja se očituje kao pomak čitanja i uzrokuje preuranjeni stop kodon u AR proteinu.	Philibert et al.Fertility and Sterility 94:472-276 2010
c.1750_1752/p.(Phe584del) (2865_2867)	CAIS	Dokazana AR gen treba netaknutu DBD domenu netaknutu, ova mutacija je jedna od tri koje uzrokuju potpunu inaktivnost AR gena. Patogenost 100%; učestalost: 23.1%. Mutacija je delecija, te se očituje kao nedostatak DNA vezujuće regije u AR proteinu.	Beitel et al.Hum Mol Genet, 3:21, 1994
c.1421_1422/p.(Glu474fs) (2536_2537)	CAIS	Nije dokazana kao samostalna mutacija. Ova mutacija uključena je u 29% slučajeva sa CAIS sindromom. Uzrokuje povećanje stop kodona za 25%. Mutacija je delecija te se očituje kao pomak čitanja i uzrokuje preuranjeni stop kodon na N-terminalom kraju AR proteina.	Thiele et al.J Clin Endocrinol Metab 84: 1751-1753, 1999
Delecija Egzona 2	CAIS	Patogenost 100%. AR protein se ne može pronaći. Učestalost 7,5% kao jedina mutacija u AR genu. Učestalost od 29,6% kao jedna od mutacija koje su uzrok CAIS. Mutacija je delecija egzona 2, te se očituje kao nedostatak DNA vezajuće domene u AR proteinu.	Avila et al. J Clin Endocrinol Metab 87. 182-188, 2002

Tablica 3. Prikaz odabranih mutacija *AR gena* , opis njihove pojavnosti i patogenosti.

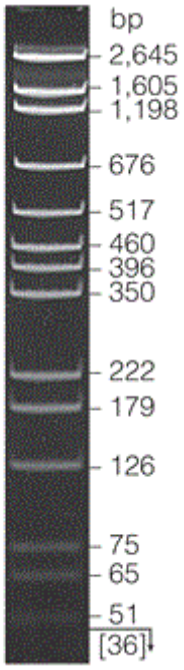
Redni broj	Naziv	Sekvenca	Tm	Duljina fragmenta
1.	AR1359F	CCT-AGC-AGG-GCA-GAT-CTT-GT	59.16°C	73 pb
2.	AR1359R	CAA-AAA-GCG-CTC-TGA-CAG-CC	60.39°C	
3.	AR2156F	GCC-GCA-CGA-GGA-TGA-C	57.69°C	244 pb
4.	AR2156R	AGA-AAT-GGT-CGA-AGT-GCC-CC	60.32°C	
5.	ARdelE2F	TCT-TCT-TGT-GGG-AGG-TTC-TTC-A	58.95°C	196 pb
6.	ARdelE2R	CAC-ACA-AAA-TCC-CCC-ACC-CA	60.47°C	
7.	AR2865F	TCC-ATG-ATA-CTC-TGG-CTT-CAC-A	58.89°C	95 pb
8.	AR2865R	CAC-AGT-CCA-AAC-CTT-ACA-ACA-CTC	59.96°C	
9.	AR2536F	CTT-TTG-GGT-TCC-ACC-CGC-T	60.53°C	151 pb
10.	AR2536R	GCC-TTC-TAG-CCC-TTT-GGT-GT	59.96°C	

Tablica 4. Parovi početnica korištenih za analizu mutacija *AR* gena PCR metodom s elektroforezom

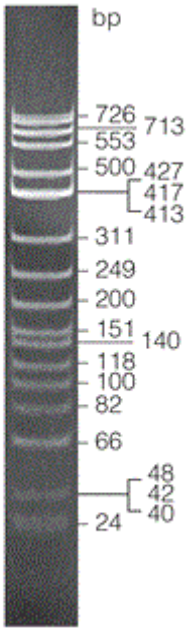
3.2.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

Elektroforeza u agaroznom gelu jedna je od metoda za analizu produkata PCR reakcije. Agaroza je prirodni linearni polisaharid sastavljen od šećera galaktoze dobiven iz agara. Čimbenici koji utječu na razdvajanje DNA su molekularna veličina i konformacija DNA, jakost i smjer električnog polja, koncentracija agaroze, prisutnost interkalirajućih boja te sastav pufera. Elektroforezom na agaroznom gelu nabijene čestice odvajaju se na osnovi veličine fragmenata (17).

Pripremljen je 2,5 % gel s dodatkom agaroze u 1 x TBE pufer te je zagrijan do vrenja uz dodatak *Sybr Safe* boje. Agaroza je ohlađena pod mlazom vode i izlivena u kalup. Stavljen je češljić kako bi se u gelu formirale jažice. Gel je polimeriziran tijekom 20 minuta. Nakon toga gel je stavljen u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazi pufer i izvađen je češljić. U uzorke DNA dodano je 3µl brom fenol plave boje (BPB, engl. *brom phenol blue*) i pipetirano u jažice gela pazeći da se uzorci ne prelijevaju. Na parafilm je stavljena boja BPB i dodani su markeri pGEM i phiX174 i stavljeni su u jažice. Uključen je izvor napona struje i elektroforeza se odvijala pri 55 V, 90 minuta. Nakon završene elektroforeze, gel je fotografiran u sustavu za slikanje gelova Image Quant 150.



Slika 8. Elektroforeza pGEM komercijalnog DNA markera. Ovaj marker je odabran zbog njegova raspona fragmenata. Raspon fragmenta je od fragmenta duljine 51 pb do fragmenta duljine 2645 pb



Slika 9. Elektroforeza Phix174 komercijalnog DNA markera. Ovaj marker je odabran zbog njegova raspona fragmenata. Raspon fragmenta je od fragmenta duljine 24 pb do fragmenta duljine 726 pb

4. REZULTATI

Analizirano je 9 uzoraka DNA izolirane iz pune krvi pacijentica s klinički suspektnim CAIS. U 8 uzoraka je pronađena jedna ili dvije od 5 mutacija koje su bile odabrane za analizu. Mutacija AR1 pronađena je u četiri uzorka, mutacija AR2 nije pronađena niti u jednom uzorku, mutacija AR3 nije pronađena niti u jednom uzorku, mutacija AR4 pronađena je u pet uzorka, a mutacija AR5 pronađena je u jednom uzorku. U osam od devet uzoraka utvrđena je jedna ili dvije od odabranih pet mutacija. Samo jedan uzorak od navedenih devet nije imao niti jednu od analiziranih mutacija. Mutacije i njihove oznake prikazane su u tablici 3. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 4.

Oznaka	Mutacija
AR1	c.1041_1062/p.(Gly349fs) (2156_2177)
AR2	c.244_248/p.(Thr82fs) (1359_1363)
AR3	c.1750_1752/p.(Phe584del) (2865_2867)
AR4	c.1421_1422/p.(Glu474fs) (2536_2537)
AR5	Delecija egzona 2

Tablica 5.Analizirane mutacije *AR* gena

Broj uzorka	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5
Uzorak 1	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna
Uzorak 2	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna
Uzorak 3	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna
Uzorak 4	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna
Uzorak 5	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna
Uzorak 6	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna
Uzorak 7	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna
Uzorak 8	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna
Uzorak 9	**Mutacija je prisutna**	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	Mutacija nije prisutna	**Mutacija je prisutna**

Tablica 6. Rezultati analize mutacija *AR* gena; prisutne mutacije su podebljane.

Pacijentica: 1

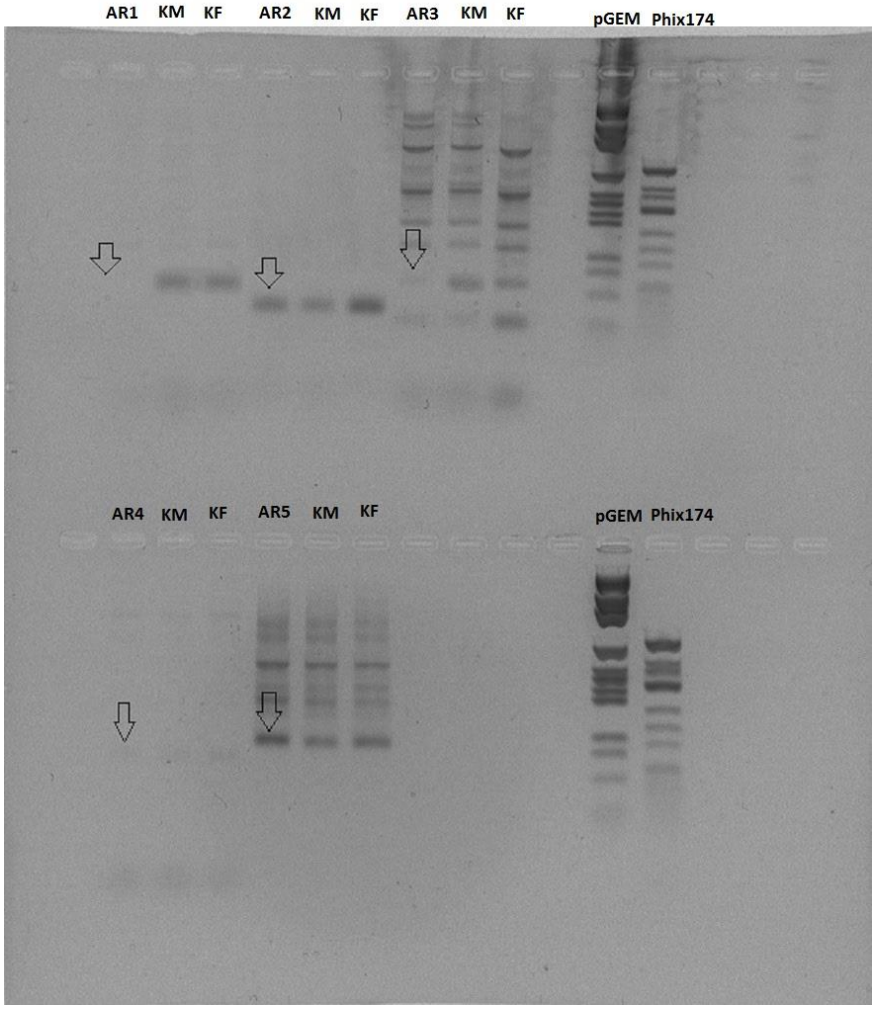
Laboratorijska oznaka: 126-10

Uputna dijagnoza: Turnerov sindrom

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1041_1062 (oznaka mutacije AR1), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 10. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 1. Prva strijelica pokazuje odsutnost benda i potvrđuje prisutnost mutacije. Druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške i ženske kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava odsustvo benda kao i kod muške i ženske kontrole te pacijentica nema tu mutaciju.

Pacijentica: 2

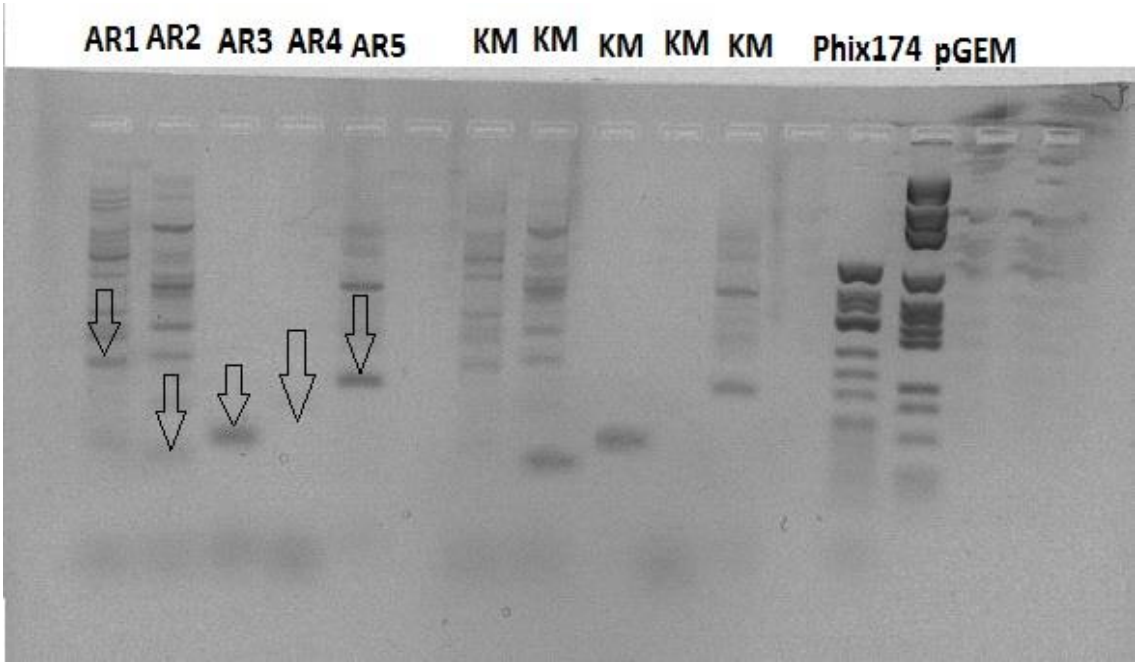
Laboratorijska oznaka: 24-13

Uputna dijagnoza: Sumnja na testikularnu feminizaciju

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak.

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica je negativna na sve analizirane mutacije.



Slika 11. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 2. Prva, druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava odsustvo benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema tu mutaciju.

Pacijentica: 3

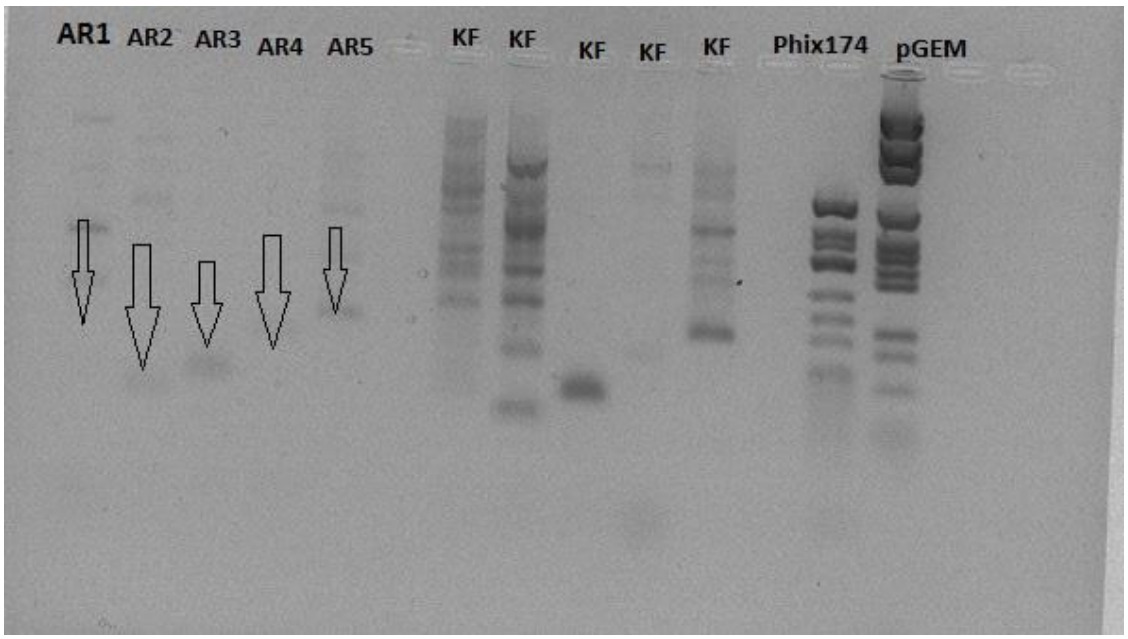
Laboratorijska oznaka: 006-06

Uputna dijagnoza: Morrisov sindrom

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1041_1062 (oznaka mutacije AR1), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 12. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 3. Prva strijelica pokazuje odsutnost benda i potvrđuje prisutnost mutacije. Druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava odsustvo benda kao i kod ženske kontrole te pacijentica nema tu mutaciju.

Pacijentica: 4

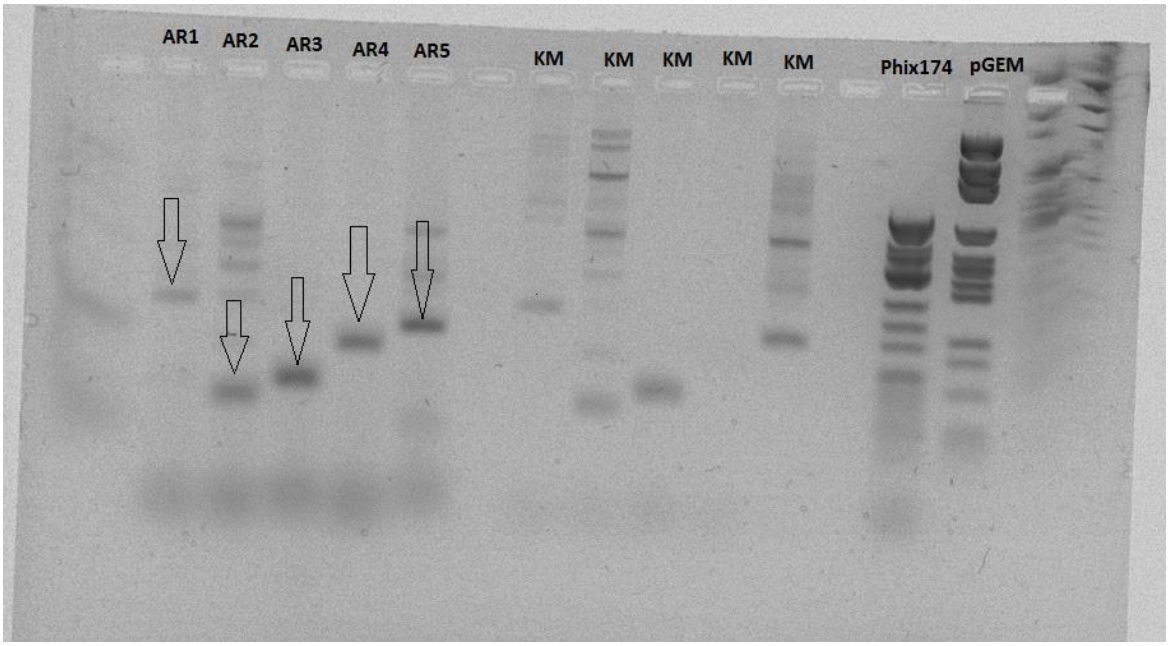
Laboratorijska oznaka: 067-07

Uputna dijagnoza: Amenorrhoea primmaria, hipergonadotropni hipogonadizam

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak.

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1421_1422 (oznaka mutacije AR4), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 13. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 4. Prva, druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava prisutstvo benda koji kod muške kontrole nedostaje, te potvrđuje prisutnost mutacije.

Pacijentica: 5

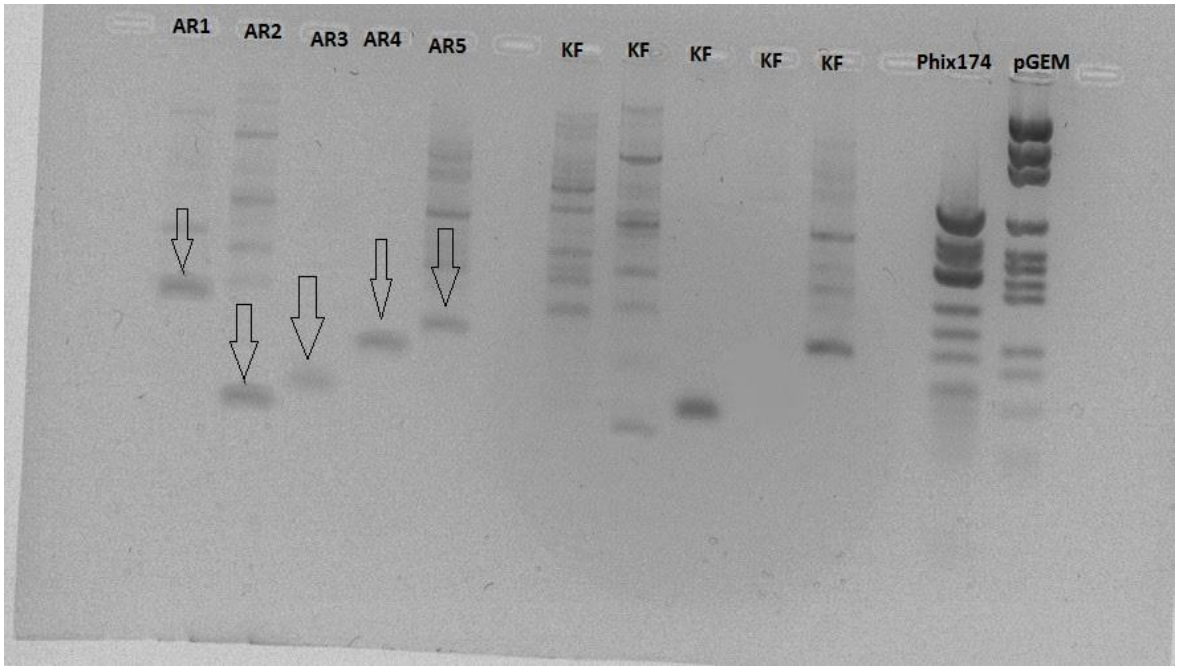
Laboratorijska oznaka: 065-08

Uputna dijagnoza: Amenorrhoea primmaria

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1421_1422 (oznaka mutacije AR4), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 14. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 5. Prva, druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava prisutstvo benda koji kod ženske kontrole nedostaje, te potvrđuje prisutnost mutacije.

Pacijentica: 6

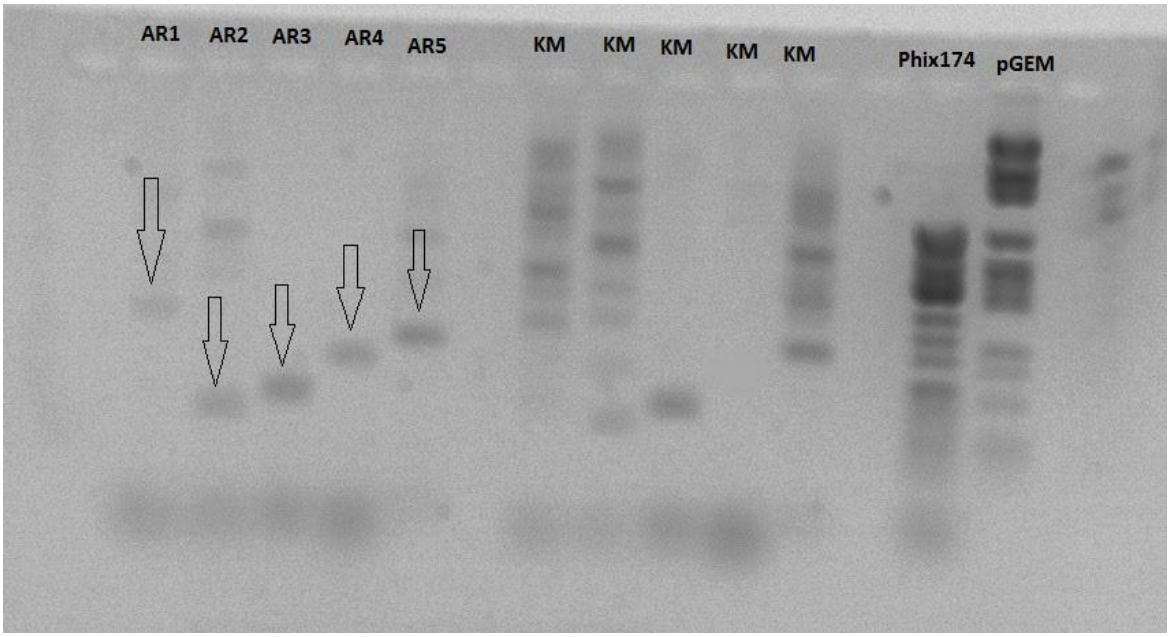
Laboratorijska oznaka: 006-12

Uputna dijagnoza: Amenorrhoea primmaria

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak.

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1421_1422 (oznaka mutacije AR4), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 15. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 6. Prva, druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava prisutstvo benda koji kod muške kontrole nedostaje, te potvrđuje prisutnost mutacije.

Pacijentica: 7

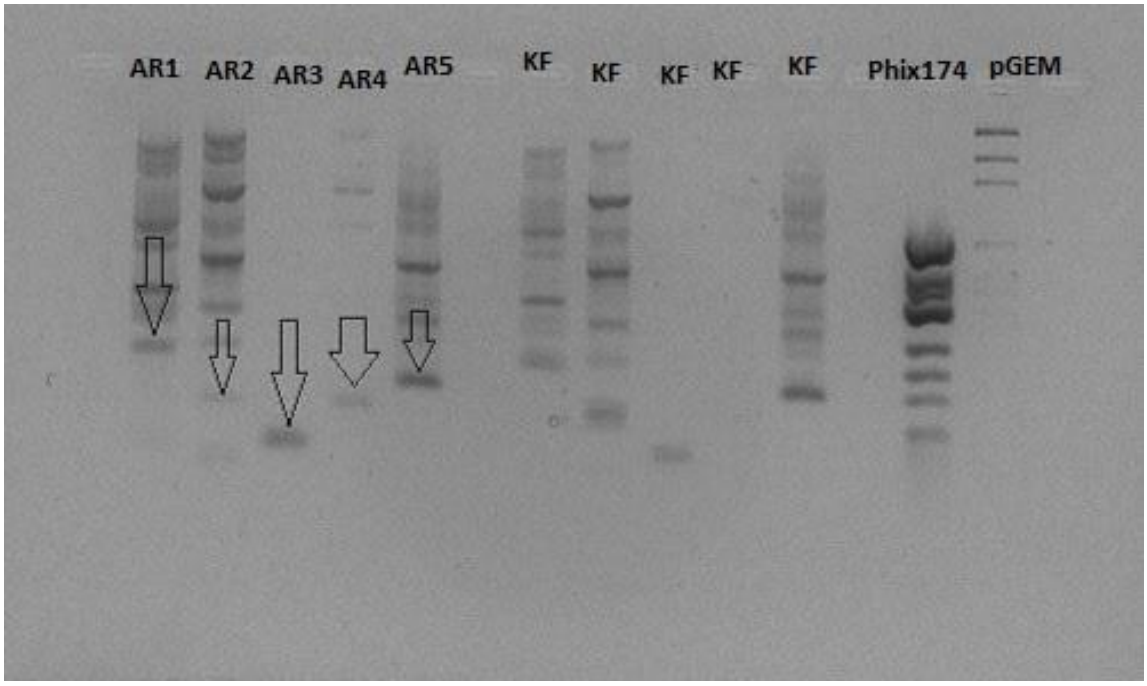
Laboratorijska oznaka: 175-15

Uputna dijagnoza: Malformacijski sindrom

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak.

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju c.1421_1422 (oznaka mutacije AR4), posljedica mutacije je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona.



Slika 16. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 7. Prva, druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava prisutstvo benda koji kod ženske kontrole nedostaje, te potvrđuje prisutnost mutacije.

Pacijentica: 8

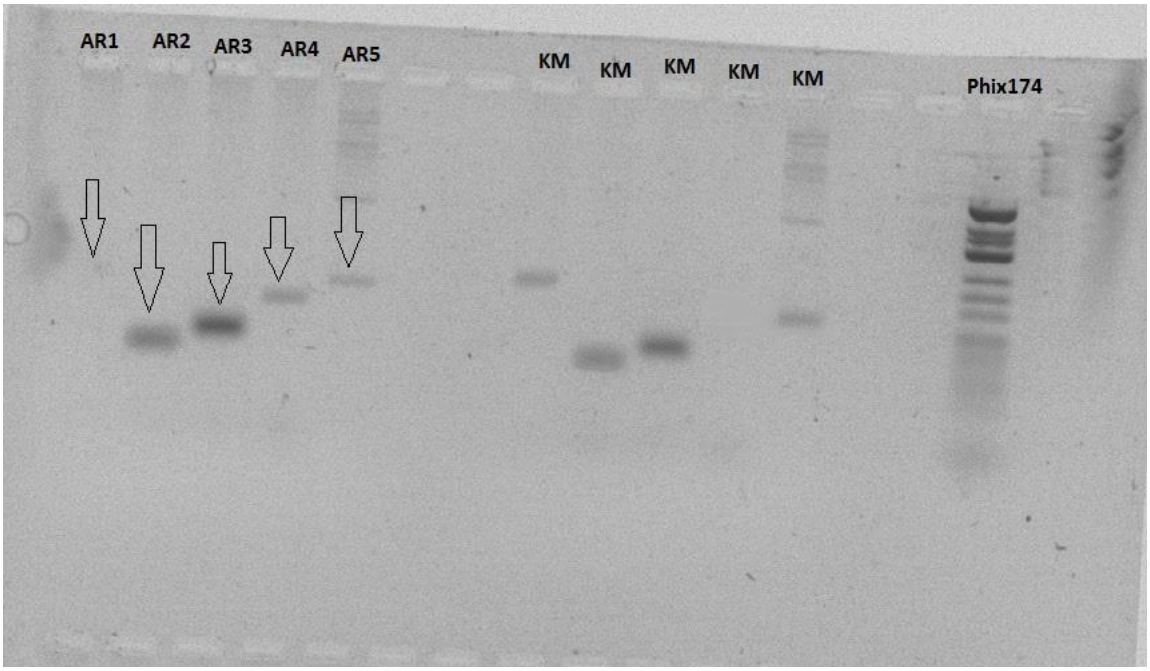
Laboratorijska oznaka: 34-16

Uputna dijagnoza: Amenorrhoea primmaria

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak.

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju 1041_1062 (oznaka mutacije AR1) i c.1421_1422 (oznaka mutacije AR4), posljedica ovih mutacija je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenih STOP kodona.



Slika 17. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 8. Prva strijelica pokazuje odsutnost benda i potvrđuje prisutnost mutacije. Druga, treća i peta strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava prisutstvo benda koji kod muške kontrole nedostaje, te potvrđuje prisutnost mutacije.

Pacijentica: 9

Laboratorijska oznaka: 94-16

Uputna dijagnoza: Amenorrhoea primmaria

Kariogram: 46,XY

FISH analiza probom za SRY regiju: Uredan hibridizacijski uzorak

Molekularno-genetička analiza *AR* gena: Pacijentica ima mutaciju u AR genu na položaju 1041_1062 (oznaka mutacije AR1) i deleciju cijelog egzona 2 (oznaka mutacije AR5), posljedica ovih mutacija je pomak čitanja DNA sekvence i stvaranje preuranjenog STOP kodona, te delecija cijele DNA vezajuće domene.



Slika 18. Fotografija agaroznog gela nakon elektroforeze PCR produkata kod pacijentice 9. Prva strijelica pokazuje odsutnost benda i potvrđuje prisutnost mutacije. Druga i treća strijelica označava prisutnost benda kao i kod muške kontrole te pacijentica nema mutaciju. Četvrta strijelica označava odsustvo benda kao i kod muške i ženske kontrole te pacijentica nema tu mutaciju. Peta strijelica pokazuje odsutnost benda i potvrđuje prisutnost mutacije.

5. RASPRAVA

U ovom radu obrađeno je 9 žena s dijagnozom sindroma potpune neosjetljivosti na androgene (CAIS). Kod liječnika su bile upućene u većini slučajeva zbog primarne amenoreje, dok su u ostalim slučajevima pacijentice imale uputnu dijagnozu Turnerovog sindroma, Morrisova sindroma ili malformacijskog sindroma. Kod niti jedne pacijentice nije utvrđeno obiteljsko nasljeđivanje no razlog tome mogli bi biti i nedostatni anamnestički podaci. Pacijenticama je napravljen prvo kariogram, te nakon dobivenih rezultata poslane su na daljnju obradu koja obuhvaća FISH testiranje na prisutnost SRY regije na Y kromosomu. Kod četiri ispitanice utvrđena je mutacija AR1 (44.44%), AR2 mutacija nije pronađena kod niti jedne ispitanice, AR3 mutacija nije pronađena kod niti jedne ispitanice, AR4 mutacija pronađena je kod pet ispitanica (55.55%), AR5 mutacija pronađena je kod jedne ispitanice (11.11%). Kod jedne ispitanice nije pronađena niti jedna od pet traženih mutacija.

Slično istraživanje provela je grupa iz Francuske na 13 pacijentica sa CAIS-om. Utvrđeno je kako su tri pacijentice imale nesmislene mutacije, kod četiri pacijentice utvrđena je insercija, kod četiri pacijentice utvrđena je delecija, jedna pacijentica imala je kompleksnu mutaciju, a jedna pacijentica imala je mutaciju izrezivanja. Kod liječnika su bile upućene ili zbog ingvinalne hernije ili zbog primarne amenoreje. Na 10 pacijentica izvršena je gonadektomija. 7 pacijentica imalo je de novo mutaciju, dok je kod 4 pacijentice utvrđeno obiteljsko nasljeđivanje (5).

U Španjolskoj je provedeno istraživanje na 46 pacijentica sa CAIS-om. Kod 22 pacijentice uputna dijagnoza bila je ingvinalna hernija, kod 21 pacijentice uputna dijagnoza bila je primarna amenoreja, a tri pacijentice su imale fetalno nejasno spolovilo. Najviše mutacija koje su bile uzrok CAIS-a pronađeno je u egzonu 1, 2 i 6. Kod 21 pacijentice utvrđeno je obiteljsko nasljeđivanje, dok se kod ostalih 25 pacijentica radilo o de novo mutacijama (18).

U Brazilu je provedeno istraživanje na 11 pacijentica sa CAIS-om. Kod 4 pacijentice uputna dijagnoza bila je ingvinalna hernija, kod šest pacijentica uputna dijagnoza bila je primarna amenoreja, dok je jedna pacijentica kao uputnu dijagnozu imala i ingvinalnu herniju i primarnu amenoreju. U 6 pacijentica utvrđeno je obiteljsko nasljeđivanje, dok je kod 5 pacijentica utvrđena de novo mutacija. Kod pacijentica s ingvinalnom hernijom učinjena je gonadektomija (10).

S podacima iz drugih zemalja i iz ovog istraživanja uočava se kako je uputna dijagnoza za detaljniju obradu ingvinalna hernija koja se u većini slučajeva pojavljuje tek nešto prije ulaska u pubertet i primarna amenoreja koja i nakon dužeg vremena trajanja puberteta traje. Podaci o obiteljskom nasljeđivanju bili su dostupni u većini radova i studija. U ovom istraživanju nije bilo moguće doći do takvih informacija zbog osjetljivosti teme ovog istraživanja.

Proučavajući slučajeve iz Francuske, Španjolske i Brazila i uspoređujući ih sa podacima iz ovog istraživanja uočava se velika raznolikost točkastih mutacija i delecija *AR* gena koje su podloga za nastajanje sindroma potpune neosjetljivosti na androgene. Upravo zbog velike heterogenosti mutacija, negativni rezultati ne mogu se koristiti za isključivanje dijagnosticiranja ovog sindroma.. Najtočniji dijagnostički postupak koji sa velikom sigurnošću može reći koja mutacija je uzrok CAIS-a je sekvenciranje *AR* gena pacijentica.

Unutar više od 100 opisanih mutacija pacijentica s CAIS-om, većinu mutacija čine točkaste mutacije (supstitucija jedne baze u DNA slijedu) koje uzrokuju preuranjenu pojavu stop kodona. U usporedbi s točkastim mutacijama, delecije većeg broja parova baza u DNA slijedu su izuzetno rijetke i one uzrokuju molekularni defekt AR proteina (6,19).

Za analizu je vrlo važno da koncentracija DNA iz uzorka bude dovoljna i da se uzorak pohrani na odgovarajući način. Iako su uzorci za ovu analizu bili skladišteni dulji vremenski period na -20°C, gubitak DNA u uzorku je bio zanemariv te se analiza mogla provesti pod normalnim uvjetima. Nakon ekstrakcije DNA uporabom Qiagen DNA kompleksa reagensa proveden je proces umnažanja DNA PCR metodom. Nakon završenog postupka umnažanja DNA, PCR produkti razdvojili su se elektroforezom u 2,5% agaroznom gelu, DNA označila fluorescentnom bojom te su se dobiveni produkti analizirali pod UV-svjetlom.

Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene je kompleksno stanje koje je regulirano složenom komunikacijom AR proteina i odgovarajućih kofaktora i faktora koji se vežu na AR i sudjeluju u transkripciji DNA. Liječnici često i ne posumnjaju na mogućnost dijagnosticiranja sindroma neosjetljivosti na androgene zbog simptoma koji su nespecifični i mogu biti povezani sa različitim uzrocima. Tek kada se pacijentice požale na amenoreju ili se u mlađoj dobi operiraju ingvinalne hernije nastale zaostajanjem nevirilizirani testisa u ingvinalnom kanalu posumnja se na mogućnost AIS-a te se pacijentice uputi na izradu kariograma. Ukoliko se kariogramom utvrdi postojanje muškog spolnog komplementa, slijedeći dijagnostički postupak je FISH analiza probom za SRY regiju te molekularno-genetička analiza mutacija *AR* gena. U

AR genu otkriveno je oko 300 mutacija koje u različitim kombinacijama i različitom stupnju pojavnosti uzrokuju jednu od tri stupnja sindroma neosjetljivosti na androgene; blagu, djelomičnu i potpunu neosjetljivost na androgene (MAIS, PAIS i CAIS) (20,21,22). Potrebno je još istraživanja ovog gena i njegove funkcije kako bi detaljno saznali ulogu i način djelovanja *AR* gena i AR proteina. Razvojem novijih tehnologija u genetici postići će se bolje detektiranje mutacija, njihova etiologija i njihovo djelovanje, te mogućnost liječenja sindroma neosjetljivosti na androgene.

6. ZAKLJUČAK

Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene nasljeđuje se X vezano recesivno i uzrokovan je s preko 300 različitih mutacija, najčešće delecija i supstitucija. Delecije i supstitucije u *AR* genu dovode do pomaka čitanja genske sekvence te stvaranja preuranjenog STOP kodona. Od 9 pacijentica čiji su uzorci pune krvi uzeti za analizu, 8 ih je imalo jednu ili dvije od odabranih pet mutacija, dok je jedna pacijentica bila bez ijedne odabrane mutacije. Pacijentice čiji uzroci su analizirani imale su slične simptome zbog kojih su se javile liječniku (primarna amenoreja i/ili ingvinalna hernija) te im je kariogramom dijagnosticiran kariotip 46,XY i uredan FISH nalaz sa probom za SRY regiju. Pacijentice su imale različite mutacije, no istovremeno vrlo slične simptome sa gotovo istom kliničkom slikom. Takvi podaci idu u prilog kompleksnosti molekularno-genetičke etiologije sindroma potpune neosjetljivosti na androgene koji je uvjetovan s preko više od 300 mutacija s različitim stupnjem učestalosti. Mnogi molekularni obrasci u CAIS-u nisu još do kraja razjašnjeni te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se uočila uzročno posljedična veza određenih mutacija u *AR* genu i molekularnih događanja unutar stanice te kako do njih dolazi.

7. SAŽETAK

Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene (CAIS) je najteža manifestacija neosjetljivosti na androgene. U klasičnom CAIS-u, pacijenti su karakterizirani s normalnim ženskim vanjskim genitalijama, bilateralnim unutar-abdominalnim ili ingvinalnim testisima, normalnim razvojem dojki, nedostatkom ili malim brojem pubičnih dlaka, hipoplastičnim ili nedostatnim Wolffovim strukturama i kariotipom 46,XY (7,9).

Cilj istraživanja bio je utvrditi postoji li kod naših pacijentica sa klinički suspektnim sindromom potpune neosjetljivosti na androgene neka od 5 najčešćih mutacija u AR genu te procijeniti incidenciju 5 najčešćih mutacija AR gena u ispitivanoj skupini.

Analizirano je 9 uzoraka pune krvi pacijentica sa CAIS-om PCR metodom s elektroforezom. Odabrano je 5 najčešćih mutacija za analizu (c.244_248, c.1041_1062), c.1750_1752), c.1421_1422/, delecija egzona 2). U 8 od 9 uzoraka je pronađena jedna od 5 mutacija koje su bile odabrane za analizu. Mutacija AR1 pronađena je u četiri uzorka, mutacija AR2 nije pronađena niti u jednom uzorku, mutacija AR3 nije pronađena niti u jednom uzorku, mutacija AR4 pronađena je u pet uzoraka, a mutacija AR5 pronađena je u jednom uzorku. Kod samo jedne pacijentice nije utvrđena niti jedna od testiranih mutacija.

Razvojem novijih tehnologija u genetici poput sekvencioniranja druge generacije (NGS) omogućena je brža i točnija detekcija mutacija, no potrebno je još istraživanja ovog gena i njegove funkcije kako bi detaljno saznali ulogu i način djelovanja *AR* gena i AR proteina. te mogućnost liječenja sindroma neosjetljivosti na androgene.

8. SUMMARY

Complete androgen insensitivity syndrome (CAIS) is the most severe manifestation of androgen insensitivity. In classic CAIS, patients are characterized by normal female external genitalia, bilateral intra-abdominal or inguinal testis, normal breast development, absent or sparse pubic hair, hypoplastic or absent Wolffian structures and 46,XY karyotype (7,9).

The aim of this study was to test whether there are some of the 5 most common mutations in the AR gene present in our patients with clinically suspected syndrome of complete androgen insensitivity and to assess the incidence of the most common five mutations in the AR gene in the test group.

A total of 9 patients' blood samples with CAIS were analysed using the PCR method with electrophoresis. 5 mutations were selected (c.244_248, c.1041_1062, c.1750_1752, c.1421_1422, the deletion of exon 2). 8 out of 9 samples show one of 5 mutations selected for analysis present. AR1 mutation has been found in four samples, AR2 mutation has not been found in any sample, AR3 mutation has not been found in any sample, AR4 mutation has been found in five samples, and AR5 mutation has been found in one sample. Only one out of nine samples does not show any of the selected mutations.

The development of new technologies in genetics such as the second-generation sequencing (NGS) has enabled faster and more accurate detection of a mutation, but more research is needed in order to discover the detailed role and activities of the *AR* gene and AR protein as well as the possibility of treating androgen insensitivity syndrome.

9. LITERATURA

1. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D et al. The DNA sequence of the human X chromosome. Nature 2005;434:325-37
2. Schaffner SF. The X chromosome in population genetics. Nat Rev Genet 2004;5:43-51
3. McPhaul MJ. Androgen receptor mutations and adrogen insensitivity. Mol Cell Endocrinol 2002;198:61-7
4. Brinkmann AO. Molecular basis of androgen insensitivity. Mol Cell Endocrinol 2001;179:105-9
5. Philibert P, Audran F, Pienkowski C, Morange I, Kohler B, Flori E et al. Complete androgen insensitivity syndrome is frequently due to premature stop codons in exon 1 of the androgen receptor gene: an international collaborative report of 13 new mutations. Fertil Steril 2010;94:472-6
6. Thiele B, Weidemann W, Schnabel D, Romalo G, Schweikert HU, Spindler KD. Complete androgen insensitivity caused by a new frameshift deletion of two base pairs in exon 1 of the human androgen receptor gene. Mol Cell Endocrinol 1999;84:1751-3
7. Minto CL, Creighton S. Sexual function in adult women with complete androgen insensitivity syndrome. Fertil Steril 2001;80:157-64
8. Wagner J, Škrlec I, Viljetić B, Pušeljić S, Stipovljev F, Heffer M et al. Sindrom potpune neosjetljivosti na androgene. Med Vjesn 2007;39:35-44
9. Zoppi S, Wilson CM, Harbison MD, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ, et al. Complete testicular feminization caused by an amino-terminal truncation of the androgen receptor with downstream initiation. J Clin Invest 1993;91:1105-12.
10. Melo KFS, Mendonca BB, Billerbeck AEC, Costa EMF, Inacio M, Silva FAQ, et al. Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:3241-50.
11. Beitel LK, Prior L, Vasiliou DM, Gottlieb B, Kaufman M, Lumbroso R et al. Complete androgen insensitivity due to mutations in the probable alfa-helical segments of the DNA-biding domain in the human androgen receptor. Hum Mol Gen 1994;3:21-7
12. Thompson J, Saatcioglu F, Jänne OA, Pavlimo JJ. Disrupted amino- and carboxyl-terminal interactions of the androgen receptor are linked to androgen insensitivity. Mol Endocrinol 2001;15:923-35

13. Gobinet J, Poujol N, Sultan C. Molecular action of androgens. Moll Cell Endocrinol 2002;198:15-24
14. QIAmp DNA Mini and Blood Mini Handbook Third Edition, Qiagen, June 2012.
15. Hećimović SK. Lančana reakcija polimerazom (PCR). U: Ambriović Ristov A. Metode u molekularnoj biologiji. Medicinska knjiga, Zagreb, 2007, str. 361-367.
16. Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, Paliouras M, Trifiro M. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. Hum Mutat 2012;33:887-94
17. Mravinac B, Bruvo Mađarić B. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu. U: Ambriović Ristov A. Metode u molekularnoj biologiji. Medicinska knjiga, Zagreb, 2007, str. 201-204.
18. Audi L, Fernandez-Cancio M, Carrascosa A, Andaluz P, Toran N, Piro C, et al. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:1876-88
19. Liu X, Fu J, Cai Z, Sun L. A novel nonsense mutation in the androgen receptor gene causes the complete androgen insensitivity sydrome. J Androl 2012;33:357-60
20. Avila DM, Wilson CM, Nandi N, Griffin JE, McPhaul MJ. Immunoreactive AR and genetic alterations in subjects with androgen resistance and undetectable AR levels in genital skin fibroblast ligand-binding assays. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:182-8
21. Holterhus PM, Werner R, Hoppe U, Bassler J, Korsch E, Ranke MB et al. Molecular features and clinical phneotypes in androgen insensitivity syndrome in the absence and presence of androgen receptor gene mutations. J Mol Med 2005;83:1005-13
22. Ahmed SF, Cheng A, Dovey L, Hawkins JR, Martin H, Rowland J, et al. Phenotypic features, androgen receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as androgen insensitivity syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:658-65

10. ŽIVOTOPIS

IVAN LEKIĆ

Datum i mjesto rođenja:

- 20.10.1994. godine, Osijek

Obrazovanje:

- 2014. – danas Integrirani sveučilišni studij Medicine na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2013. – 2016. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2009. – 2013. 1. gimnazija Osijek (Opća), Osijek

Dodatna edukacija:

- Simpozij Autosomno dominantna policistična bubrežna bolest, Osijek, 5.-7. 5. 2016.
- *4th Central Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids in Non-Invasive Prenatal Diagnosis*, Split, 25.-26.5.2016.