

УДК 61:575

**ВРОЖДЕННАЯ ДИСФУНКЦИЯ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ: ПОИСК
МУТАЦИЙ В ГЕНЕ CYP21A2****© А. А. Рахимкулова^{1*}, В. Л. Ахметова¹, О. А. Малиевский²,
Э. К. Хуснутдинова^{1,3}**¹Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН
Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.
Тел.: +7 (347) 235 60 88.²Башкирский государственный медицинский университет
Россия, Республика Башкортостан, 450000 г. Уфа, ул. Ленина, 3.
Тел.: +7 (347) 272 11 60.³Башкирский государственный университет
Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, ул. Заки Валиди, 32.
Тел.: +7 (347) 272 63 70.

E-mail: rahimkulova.aigul@mail.ru

Мутации в гене CYP21A2, кодирующем фермент 21-гидроксилаза, являются причиной развития одного из наиболее распространенных наследственных заболеваний, врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН). Более 90% случаев данного заболевания связано с нарушениями функционирования данного фермента. Уровень остаточной активности 21-гидроксилазы определяют клиническую форму и тяжесть течения заболевания. Нами проведен анализ гена CYP21A2 у 120 больных ВДКН, проживающих на территории Республики Башкортостан (РБ), в результате которого определен спектр мутаций, характерный для данного региона, и установлено соответствие выявленных мутаций клиническим формам, что в некоторой степени позволяет расширить представление о молекулярно-генетических механизмах развития такого гетерогенного заболевания как ВДКН.

Ключевые слова: ген, 21-гидроксилаза, врожденная дисфункция коры надпочечников, мутация.

Введение

Врожденная дисфункция коры надпочечников – группа заболеваний с аутосомно-рецессивным типом наследования, обусловленных врожденным дефектом ферментов биосинтеза кортикостероидов [1, 2]. Более 90% случаев ВДКН связано с возникновением мутаций в гене CYP21A2, кодирующем 21-гидроксилазу. Классическая форма ВДКН характеризуется полной или частичной потерей функциональной активности данного фермента, что в первом случае приводит к развитию сольтеряющей формы (СТФ), а во втором – простой вирильной (ПФ). Частота встречаемости классической формы ВДКН в мире составляет в среднем 1:15000–16000 новорожденных, в России – 1:8662, в Республике Башкортостан – 1:8974 [3, 4]. При неклассической форме (НФ) остаточная активность 21-гидроксилазы составляет 20–60%, а частота в среднем составляет 1:1000 новорожденных [1].

Ген CYP21A2 локализован на коротком плече 6 хромосомы на расстоянии в 30 kb от высокоомологичной ему последовательности псевдогена CYP21A1P, неактивного вследствие присутствия в нем 15 мутаций. На сегодняшний день в гене CYP21A2 идентифицировано около 200 мутаций, более 90% из которых являются результатом межгенных рекомбинаций между функциональным геном CYP21A2 и псевдогеном CYP21A1P, при этом список описываемых нарушений гена 21-гидроксилазы непрерывно обновляется [5].

В связи с этим цель настоящей работы заключалась в анализе гена CYP21A2 у больных ВДКН из Республики Башкортостан, определение спектра мутаций, характерных для данного региона и сопоставление идентифицированных мутаций с клиническими формами заболевания.

Материалы и методы

Молекулярно-генетический анализ гена CYP21A2 был проведен у 120 больных ВДКН, состоящих на учете в отделении эндокринологии Республиканской детской клинической больницы г. Уфы и проживающих на территории Республики Башкортостан. Из них 63 больных имели сольтеряющую форму (52.5%), 46 – простую вирильную форму (37.5%), 12 – неклассическую форму ВДКН (10%).

Геномная ДНК больных ВДКН и членов их семей была выделена из лейкоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [6].

Наиболее распространенные мутации гена CYP21A2: *delA2/LGC*, *p.Pro30Leu*, *I2splice*, *p.Ile172Asn*, *ClusterE6*, *p.Val281Leu*, *p.Gln318X*, *p.Arg356Trp* и *Pro453Ser*, идентифицировались путем проведения ПЦР различной модификации с последующим, при необходимости, ПДРФ-анализом. В случае отсутствия у больного распространенных и легко диагностируемых мутаций проводился анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP-анализ), по результатам которого осуществлялось секвенирование. Высокая гомология CYP21A2 и CYP21A1P и присутствие в

* автор, ответственный за переписку

псевдогене исследуемых в активном гене точковых мутаций препятствует проведению анализа гена *CYP21A2* путем прямого использования геномной ДНК больных с диагнозом ВДКН и соответствующих праймеров. Однако существующие различия в последовательностях псевдогена и активного гена позволяют получить фрагмент последнего с помощью ПЦР с использованием *CYP21A2* специфичных праймеров: BF1 (F-CCCAGGTGGGGGCGGACACTA) и 21BR (R-AAATTAAGCCTCAATCCTCTGCAGCG) [7]. Дальнейший анализ осуществлялся с использованием амплификата активного гена.

Результаты и обсуждение

В результате проведенного анализа выявлено 11 мутаций гена *CYP21A2*. Наиболее распространенной мутацией оказалась делеция/конверсия *delA2/LGC*, обнаруженная на 29.16% хромосом. Частота данных мутаций в РБ соответствует таковой в европейских странах. Так, во Франции она составляет 25%, Германии – 27.4%, Италии – 26, Нидерландах – 31.9% [8]. Нами данная мутация обнаружена у 35 больных с СТФ, из них у 18 в гомозиготном состоянии, и 14 больных с ПФ заболеванием, но только в компаунд-гетерозиготном состоянии с другой мутацией.

Вторая по частоте мутация сплайсинга *I2splice* (*c.293-A/C>G*) гена *CYP21A2* определена на 14.58% хромосом, что несколько ниже, чем в популяциях Европы [8]. Согласно данным литературы большинство гомозиготных носителей данной мутации имеют СТФ ВДКН [5], что соответствует полученным нами данным: все 7 больных с мутацией сплайсинга в гомозиготном состоянии имеют СТФ заболевания.

Замена аргинина на триптофан в 356 положении (*p.Arg356Trp*) выявлена у 22 больных с СТФ, 5 больных с ПФ и 1 больного с НФ ВДКН, что составляет 11.7% и превышает среднюю частоту данной мутации в странах Европы в 1.5-2 раза [8].

Мутация *p.Ile172Asn* гена *CYP21A2* идентифицирована у 1 больного с СТФ заболевания, но в кластере с мутацией *p.Gln318X* и 12 больных (5%) с ПФ ВДКН, что соответствует литературным данным, согласно которым данная мутация ассоциирована с ПФ заболевания.

У 7 больных с СТФ и 1 больного с НФ ВДКН и только в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями нами обнаружена мутация *p.Gln318X*. В целом, частота данной мутации в РБ (3.3%) сопоставима с европейской, которая варьирует от 2 до 5.9% [8].

Мутация *p.Val281Leu* гена *CYP21A2* ассоциирована, как правило, с НФ ВДКН. В РБ данная мутация определена только у больных с НФ заболевания с частотой 2.1%.

Также у больных с НФ ВДКН встречается мутация *p.Pro30Leu* гена *CYP21A2*. Нами данная му-

тация была обнаружена у 3 больных с ПФ заболевания (1.7%), причем у одного в гомозиготном состоянии.

Кроме того, посредством SSCP-анализа и последующего секвенирования образцов с измененной подвижностью одонитевых фрагментов у 4 больных идентифицировано 4 мутации: *delle384*, *F307+Int*, *p.ArgR426Cys* и *p.Pro453Ser*. Ранее не описанная мутация *delle384* идентифицирована у 1 больного с СТФ 21-гидроксилазной недостаточности в компаунд-гетерозиготном состоянии с *delA2/LGC*. Инсерция тимина в 1762 положении *F307+Int* также обнаружена у одного больного (0.4%), но в сочетании с мутацией *I172N*, что привело к развитию ПФ ВДКН. Мутация *p.ArgR426Cys* гена *CYP21A2* была выявлена у одного больного с СТФ заболевания в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *I2splice* (0.4%). Замена пролина на серин в 453 положении, *p.Pro453Ser*, обнаружена у 1 больного с ПФ ВДКН в кластере с мутацией *I2splice* (*P453S+I2splice* (0.4%)). Помимо описанного кластера, в гене *CYP21A2* выявлено присутствие двух мутаций на одной хромосоме еще у 7 больных: *p.Arg356Trp+p.Gln318X* (2.1%), *delA2/LGC+p.Val281Leu* (0.4%), *p.Ile172Asn+p.Gln318X* (0.4%). Такое сцепление мутаций или кластер унаследован больным либо от матери, либо от отца. Кластеризация мутаций на одной хромосоме внутри нуклеотидной последовательности гена характерна для гена *CYP21A2*, что возможно, связано с большими генными конверсиями или многократными мутационными событиями.

Анализ распределения частот мутаций в гене *CYP21A2* в трех группах пациентов с разными формами заболевания показал статистически значимые отличия. Так, у больных с СТФ делеция/конверсия *delA2/LGC* гена *CYP21A2* выявлена с частотой в 2.4 раза большей, чем у больных с ПФ (41.3% и 17.2%, соответственно, $\chi^2 = 13.7$, $p = 0.002$) и с НФ недостаточности 21-гидроксилазы (41.3% и 17.5%, соответственно, $\chi^2 = 6.0$, $p = 0.007$). Мутации *I2splice*, *R356W* и *Q318X* также встречались с более высокой частотой в группе больных с СТФ, чем с ПФ и НФ (23.0%, 9.4% и 0.0%, соответственно, $\chi^2 = 6.4$, $p = 0.006$; 18.3%, 8.3% и 4.2%, соответственно, $\chi^2 = 2.9$, $p = 0.047$ и $\chi^2 = 1.6$, $p = 0.101$; 7.5%, 0.6% и 4.2%, соответственно, $\chi^2 = 1.8$, $p = 0.091$ и $\chi^2 = 0.05$, $p = 0.414$, соответственно). Напротив, мутация *I172N* была характерна для группы больных с ПФ, тогда как в группе с СТФ заболевания она определена в кластере с делецией/конверсией *delA2/LGC*, а у больных с НФ не идентифицирована (13.3%, 0.4% и 0.0%, соответственно, $\chi^2 = 12.07$, $p = 0.001$). Мутация *V281L* гена *CYP21A2* выявлена только у больных с НФ (20.8%), за исключением одного больного с ПФ, у которого она обнаружена в кластере с делецией/конверсией *delA2/LGC* (0.6%). Мутация *P30L* гена *CYP21A2* идентифицирована

только у больных с ПФ (3.3%). Таким образом, для сольтеряющей, простой вирильной и неклассической форм недостаточности 21-гидроксилазы показан свой спектр диагностически значимых мутаций.

Помимо мутаций, приводящих к развитию тех или иных форм ВДКН, в гене *CYP21A2* выявлено множество полиморфных вариантов, несущих нейтральный характер и фенотипически не проявляющихся (*rs6449*, *rs6463*, *rs2075561*, *rs6462*, *S374S*, *rs6474*, *rs6455*, *rs6463*, *rs6472*). С наибольшей частотой определены полиморфные варианты *rs6449* (38.7%), *rs6462* (65.3%), *rs6474* (56.7%), *S374S* (17.7%).

Проведенное нами молекулярно-генетическое обследование 120 семей с ВДКН, проживающих в Республике Башкортостан, показало, что 66% изученных ВДКН семей оказались полностью информативными для ДНК-диагностики прямым методом, 14% – частично информативными. 20% семей с ВДКН из РБ – абсолютно неинформативными. Во всех семьях при использовании прямых методов молекулярной диагностики были определены носители мутантных хромосом.

Таким образом, полученные данные представляют научную и практическую значимость для медико-генетического консультирования с целью повышения эффективности молекулярно-генетичес-

кой диагностики ВДКН в РБ в связи с ее высокой распространенностью в данном регионе и профилактики рождения больных детей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haider S. et al. Structure–phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013. Т. 110. №7. С. 2605–2610.
2. Lee H. H. CYP21 mutations and congenital adrenal hyperplasia // Clinical genetics. 2001. Т. 59. №5. С. 293–301.
3. Nimkarn S., Lin-Su K., New M. I. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia // Endocrinology & Metabolism Clinics of North America. 2009. Т. 38. №4. С. 699–718.
4. Рамова З. Ф. Распространенность и клинико-диагностическая характеристика гипокортицизма у детей в Республике Башкортостан // Автореф. дисс. канд. мед. наук. Уфа. 2010.
5. White P. C., Speiser P. W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency // Endocrine reviews. 2000. Т. 21. №3. С. 245–291.
6. Mathew C. G. The isolation of high molecular weight eukaryotic DNA // Methods in molecular biology / Ed. Walker J. M. N. Y.; Humana press. 1984. P. 31–34.
7. Charfeddine I. B. et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 50 Tunisian patients: Characterization of three novel polymorphisms // Gene. 2012.
8. Baş F. et al. CYP21A2 Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype–phenotype correlation in Turkish children // Journal of clinical research in pediatric endocrinology. 2009. Т. 1. №3. С. 116.

Поступила в редакцию 10.09.2013 г.