УДК 606:61, 602

АНАЛІЗ МУТАЦІЙ ГЕНА *CYP21A2* У ХВОРИХ НА ВРОДЖЕНУ ГІПЕРПЛАЗІЮ КОРИ НАДНИРНИКІВ З УКРАЇНИ

С.Ю. ЧЕРНУШИН, Л.А. ЛІВШИЦЬ

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
E-mail: livshits@imbg.org.ua

Наведено дані щодо розповсюдження мутацій гена CYP21A2 (делеція/конверсія гена CYP21A2, c.290-13C>A/G, E110Vfs, I172N, кластер мутацій I236N, V237E, M239K, V281L, Q318X, R356W) у пацієнтів із України з різними клінічними формами вродженої гіперплазії кори наднирників. Найбільш частою мутацією в досліджуваній групі (27 пацієнтів) є делеція/конверсія гена CYP21A2. Обговорюються можливі закономірності поширення досліджуваних мутацій в різних популяціях світу та асоціація генотипу з клінічним фенотипом хворих.

Ключові слова: *21-гідроксилаза, CYP21A2, вроджена гіперплазія кори наднирників.*

Вступ. Вроджена гіперплазія кори наднирників (ВГКН) – група спадкових захворювань з аутосомно-рецесивним типом успадкування [1]. ВГКН призводить до дефіциту ферментів 21-гідроксилази, 11-бета-гідроксилази, 17-альфа-гідроксилази, стероїдогенного гострофазного регуляторного білка, 20, 22 десмолази, що залучені до синтезу кортизолу.

Недостатність 21-гідроксилази є причиною понад 90 % випадків ВГКН. Частота захворювання на ВГКН, що спричинена недостатністю 21-гідроксилази, становить 1:15000. Порушення синтезу даного ферменту зумовлено мутаціями у гені *CYP21A2* [2].

Згідно з даними скринінгу новонароджених частота носійства мутантного алеля гена *CYP21A2* складає 1 на 55 осіб в популяції здорового населення [3,4].

Ген *CYP21A2* та псевдоген *CYP21A1P* локалізовані в регіоні HLA класу III, що знаходиться в хромосомній ділянці 6p21.3. На сьогоднішній день ідентифіковано 194 мутації гена *CYP21A2* [5]. Псевдоген *CYP21A1P* не кодує функціональний фермент 21-гідроксилазу через наявність у ньому мутацій c.290-13C>A/G, E110Vfs, Q318X, які призводять до зсуву рамки зчитування та виникнення стоп-кодону [6].

© С.Ю. ЧЕРНУШИН, Л.А. ЛІВШИЦЬ, 2016

Важливо зазначити, що псевдоген *CYP21A1P* на 98 % гомологічний до кодуючої послідовності гена *CYP21A2* та на 96 % до некодуючої [6].

Метою роботи було дослідження розповсюдження мутацій гена *CYP21A2* (делеція/конверсія гена *CYP21A2*, c.290-13C>A/G, E110Vfs, I172N, кластер мутацій I236N, V237E, M239K, V281L, Q318X, R356W) в групі пацієнтів з ВГКН з України.

Матеріали та методи. Дослідження мутацій проведено серед 27 пацієнтів із ВГКН та їхніх батьків з різних регіонів України. Зразки геномної ДНК виділяли з лейкоцитів периферійної крові та очищали з використанням стандартної методики фенольно-хлороформної екстракції [7]. Згідно з основними нормами біоетики про використання людини як об'єкта дослідження інформовані згоди на проведення досліджень отримано від усіх індивідів.

Молекулярно-генетичний аналіз делеції/конверсії гена *CYP21A2*, точкових мутацій c.290-13C>A/G, I172N, V281L, Q318X, R356W кластеру мутацій I236N, V237E, M239K та восьминуклеотидної делеції E110Vfs проведено згідно з описаними раніше методиками [8].

ПЛР здійснювали в автоматичному режимі на ампліфікаторі 2720 ThermalCycler («AppliedBiosystems», США) з використанням Long PCR EnzymeMix («Fermentas», Литва).

Реакція проводилась в такому режимі: денатурація 94 °С – 7 хв; 94 °С – 30 с, 66 °С – 0,4 °С кожний цикл – 30 с, 68 °С – 6 хв 30 с – 10 циклів; 94 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 68 °С – 6 хв 30 с + 3 с кожний цикл – 20 циклів; фінальна елонгація – 15 хв.

Реакційна суміш об'ємом 15 мкл складалася з 1 × Long PCR Buffer, 4 мМ $MgCl_2$, по 300 мкМ кожного трифосфату, олігонуклеотиди – 10 мМ, BSA – 2 мкг/мл, 1 од. акт. Long PCR Enzyme Mix («Fermentas», Литва), бетаїн – 1 М.

Аналіз довжини рестрикційних фрагментів продуктів ампліфікації проводили за допомо-

гою електрофоретичного розділення продуктів гідролізу ампліфікатів специфічними ендонуклеазами рестрикції з подальшим розділенням в 1,2%-ному агарозному гелі.

Результати досліджень та обговорення. Серед 27 хворих у 26 виявлено досліджувані мутації і у одного мутацій не виявлено. В цій групі пацієнтів проведено шість пренатальних діагностик з використанням аналізу делеції/конверсії гена *CYP21A2* та мутацій c.290-13C>A/G і I172N, виявлених раніше в даних родинах. В чотирьох випадках у плода ідентифіковано генотипи, ідентичні до виявлених раніше у пробандів з відповідних родин. В одному з випадків плід виявився гетерозиготним носієм мутації, а ще в одному плід не успадкував ідентифікованих у пробанда мутацій.

Результати аналізу розповсюдження досліджуваних нами мутацій у пацієнтів з України наведені в таблиці. Найбільш частою виявилася делеція/конверсія гена *CYP21A2*, частота якої становила 35,2 % усіх проаналізованих мутантних хромосом, при цьому п'ять пацієнтів були гомозиготами за зазначеною мутацією, а у решти вона виявлена в компаунді з іншими мутаціями гена *CYP21A2*. Другою за розповсюдженням виявилася мутація c.290-13C>A/G – 16,7 %. При цьому два пацієнти були гомозиготами, а у решти вона виявлена у компаунді з іншими мутаціями гена *CYP21A2*. Третьою виявилася мутація Q318X. Лише один пацієнт був гомозиготою за цією мутацією, а у решти вона виявлена у компаунді з іншими мутаціями гена *CYP21A2*. Частоти мутацій V281L, R356W, I172N, E110Vfs не перевищували 10 %, та жодної гомозиготи за даними мутаціями не виявлено.

Частоти делеції/конверсії гена *CYP21A2* та мутації c.290-13C>A/G близькі до відповідних показників в східноєвропейських країнах, зокрема, в Чехії [11]. В той самий час частоти мутацій Q318X (11,1 %) та I172N (3,7 %), значно відрізняючись від європейських популяцій [17], є дуже подібними до частот даних мутацій у Туреччині (11,5 та 4 %) [10].

Делеція/конверсія гена *CYP21A2* є найчастішою в групі пацієнтів, яку ми досліджували, та однією з найбільш частих мутацій в багатьох популяціях Європи і навіть в Японії. Разом з тим у пацієнтів з Мексики мутація зустрічається з частотою лише 1 %, а найбільш частою виявилася мутація c.290-13C>A/G, яка також є найпо-

Розповсюдження мутацій гена *CYP21A2* серед пацієнтів з Україні та деяких країн Європи, Азії та Південної Америки [9–16]

Мутація	Частота мутацій, %							
	Україна	Чехія	Туреччина	Німеччина	Нідерланди	Фінляндія	Японія	Мексика
Делеція/конверсія гена *CYP21A2*	35,2	38,6	17,0	27,4	31,9	40,0	18,0	1,0
c.290-13C>A/G	16,7	24,0	28,5	30,3	28,1	12,0	29,0	47,0
Q318X	11,1	3,5	11,5	4,8	3,5	2,0	0,0	4,3
V281L	9,3	9,3	3,5	2,9	2,2	3,0	1,0	8,5
R356W	3,7	3,9	3,5	4,5	8,4	-	13,0	7,4
I172N	3,7	11,2	4,0	19,7	12,4	29,0	13,0	11,7
E110Vfs	1,9	1,2	3,0	1,6	4,3	0,0	0,0	2,1
P30L	0,0	3,5	1,0	2,6	0,3	0,0	0,0	8,5
Кластер мутацій I236N, V237E, M239K	0,0	0,0	1,0	1,0	3,0	10,0	5,0	0,0
Хромосоми з неідентифікованими мутаціями, %	18,5	4,8	22,0	1,3	0,0	4,0	26,0	24,0
Кількість проаналізованих хромосом	54	508	200	310	370	102	102	94

ширенішою в популяції Туреччини та Німеччини. Подібний характер поширення мутацій серед різних етнічних груп може свідчити на користь їхнього рекурентного походження, що можна пояснити за рахунок генної конверсії між частинами послідовності гена *CYP21A2* та псевдогена *CYP21A1P*.

В нашому дослідженні визначено *de novo* випадок делеції/конверсії гена *CYP21A2* у пацієнта за генотипом делеція/конверсія гена *CYP21A2*/c.290-13C>A/G. За результатами молекулярно-генетичного аналізу даних мутацій у батьків пацієнта встановлено, що батько є носієм мутації c.290-13C>A/G, в той час як у матері не виявлено жодної з двох ідентифікованих у пробанда мутацій. За результатами підтвердження біологічного батьківства/материнства можна зробити висновок про походження *de novo* делеції/конверсії гена *CYP21A2* в статевих клітинах матері.

За існуючою класифікацією мутації гена *CYP21A2* поділяються на чотири групи згідно з встановленою *in vitro* залишковою активністю ферменту 21-гідроксилази [3]. До групи 0 мутацій, що призводять до повної відсутності ферменту, відносять делецію/конверсію гена *CYP21A2* та E110Vfs і кластер мутацій у 6-му екзоні (I236N, V237E, M239K), L307Pfs, Q318X, R356W. До групи А відносять мутацію c.290-13C>A/G, при якій спостерігають залишкову активність ферменту, до групи В – мутацію I172N, при якій активність ферменту складає не більше 10 % від нормальної. До групи С відносять мутації P30L, V281L, P453S, при яких активність ферменту становить 10–75 % від норми. Показано, що саме мутації групи С призводять до розвитку некласичної форми ВГКН [18, 19].

Для досліджуваної групи пацієнтів описано клінічні прояви класичних форм ВГКН та виявлено генотипи, до складу яких входили мутації групи 0 та А – делеція/конверсія гена *CYP21A2*/Q318X, делеція/конверсія гена *CYP21A2*/c.290-13C>A/G, c.290-13C>A/G/c.290-13C>A/G, делеція/конверсія гена *CYP21A2*, делеція/конверсія гена *CYP21A2*. Такі результати підтверджують отримані іншими авторами дані стосовно кореляції генотип – фенотип для класичних форм ВГКН [3].

Лише в двох з 27 пацієнтів виявлено некласичні форми захворювання (7,4 %). У цих пацієнтів виявлено мутацію V281L, яка належить до групи С, в компаунді із делецією/конверсією гена *CYP21A2* та не ідентифікованою нами мутацією. Важливо зазначити, що в одного пацієнта з мутацією V281L спостерігалось передчасне статеве дозрівання.

Розширення спектра мутацій, що аналізуються, та дослідження асоціації генотип – фенотип дозволять поглибити наші знання про природу ВГКН і поліпшити прогноз перебігу захворювання та персоніфікацію лікування.

Висновки. За результатами дослідження отримано дані щодо розповсюдження делеції/конверсії гена *CYP21A2*, c.290-13C>A/G, Q318X, V281L, R356W, I172N, E110Vfs серед пацієнтів з різними клінічними формами ВГКН з України. Найбільш частою в досліджуваній групі є делеція/конверсія гена *CYP21A2*. Згідно з результатами аналізу асоціації генотип – фенотип у пацієнтів з класичними формами ВГКН виявлено такі мутації: делеція/конверсія гена *CYP21A2*, c.290-13C>A/G, Q318X та R356W, які призводять до повної відсутності або залишкової активності ферменту 21-гідроксилази. В той же час у пацієнтів з некласичною формою захворювання в генотипі виявлено мутацію V281L, яка відноситься до групи С та призводить до синтезу ферменту на рівні 50 %.

ANALYSIS OF *CYP21A2* GENE MUTATIONS IN PATIENTS FROM UKRAINE WITH CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

S.Yu. Chernushyn, L.A. Livshits

Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv
E-mail: livshits@imbg.org.ua

In the article the data on the distribution of *CYP21A2* gene mutations (gene deletion/conversion, c.290-13C>A/G, E110Vfs, I172N, cluster of mutations I236N, V237E, M239K, V281L, Q318X, R356W) among Ukrainian patients with congenital adrenal hyperplasia of different clinical phenotypes are presented. The most common mutation in the studied group (n = 27) is the *CYP21A2* gene deletion/conversion. Possible patterns of the studied mutations distribution in different populations of the world and the patients' genotype – phenotype association are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Merke, D.P., and Bornstein, S.R., Congenital adrenal hyperplasia, *Lancet*, 200, vol. 365, pp. 2125–2136.

2. Levine, L.S. Congenital adrenal hyperplasia, *Pediatr. Rev.*, 2000, vol. 21, no. 5, pp. 159–170.
3. Baumgartner-Parzer, S.M., Nowotny, P., Heinze, G., Waldhдusl, W., and Vierhapper, H., Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, vol. 90, no. 2, pp. 775–778.
4. New, M.I., Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Endocrino. Metab.*, 2006, vol. 91, no. 11, pp. 4205–4214.
5. Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S.T., Abeysinghe, S., Krawczak, M., and Cooper, D,N., Human gene mutation database (HGMD®): 2003 update, *Hum. Mutat.*, 2003, vol. 21, no. 6, pp. 577–581.
6. Haider, S., Islam, B., D'Atri, V., Sgob, M., Poojari, C., Sun, L.,Yuen, T., Zaidi, M., and New, M.I., Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia, *Proc. Nat. Cad. Sci. USA,* 2013, vol. 110, no. 7, pp. 2605–2610.
7. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular cloning: A laboratory manual,* 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989, 1626 p.
8. Chernushyn, S.Yu, and Livshits, L.A., Analysis *CYP21A2* gene mutations technique in patients with congenital adrenal hyperplasia, *Biotechnol. Acta*, 2014, vol. 7, no. 1, pp. 75–79.
9. Stikkelbroeck, N.M., Hoefsloot, L.H., de Wijs, I.J., Otten, B.J., Hermus, A.R., and Sistermans, E.A., CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in the Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations, *J. Clin. Endocrinol. Metabol.*, 2003, vol. 88, no. 8, pp. 3852–3859.
10. Baş, F., Kayserili, H., Darendeliler, F., Uyguner, O., Günöz, H., Yüksel Apak, M., Atalar, F., Bundak, R., Wilson, R.C., New, M.I., Wollnik, B., and Saka, N., *CYP21A2* gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children, *J. Clin. Res. Pediat. Endocrinol.*, 2009, vol. 1, no. 3, pp. 116–128.
11. Vrzalová, Z., Hrubá, Z., St'ahlová Hrabincová, E., Pouchlá, S., Votava, F., Kolousková, S., and Fajkusová, L., Identification of CYP21A2 mutant alleles in Czech patients with 21-hydroxylase deficiency, *Int. J. Mol. Med.*, 2010, vol. 26, no. 4, pp. 595–603.
12. Sadeghi, F., Yurur-Kutluay, N., Berberoglu, M., Cetinkaya, E., Aycan, Z., Kara, C., Ilgin Ruhi, H., Ocal, G., Sklar, Z., Elhan, A,. and Tukun, A., Identification of frequency and distribution of the nine most frequent mutations among patients with 21-hydroxylase deficiency in Turkey, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2008, vol. 21, no. 8, pp. 781–787.
13. Krone, N., Braun, A., Roscher, A.A., Knorr, D., and Schwarz, H.P., Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from Southern Germany, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000, vol. 85, no. 3, pp. 1059–1065.
14. Levo, A., and Partanen, J., Mutation-haplotype analysis of steroid 21-hydroxylase (CYP21) deficiency in Finland. Implications for population history of defective alleles, *Hum. Genet.*, 1997, vol. 99, no. 4, pp. 488–497.
15. Higashi, Y., Hiromasa, T., Tanae, A., Miki. T., Nakura, J., Kondo, T., Ohura, T., Ogawa, E., Nakayama, K., and Fujii-Kuriyama. Y., Effects of individual mutations in the P450(C21) pseudogene on the P-450(C21) activity and distribution in the genomes of congenital steroid 21-hydroxylase deficiency, *J. Biochem. (Tokyo)*, 1991, vol. 109, no. 4, pp. 638–644.
16. Ordonez-Sanchez, M.L., Ramirez-Jimenez, S., Lopez-Gutierrez, A.U., Riba, L., Gamboa-Cardiel, S., Cerrillo-Hinojosa, M., Altamirano-Bustamante, N., Calzada-Leon, R., Robles-Valdes, C., Mendoza-Morfin, F., and Tusie-Luna, M.T., Molecular genetic analysis of carrying steroid 21-hydroxylase deficiency in the Mexican population: idendification of possible new mutations and high prevalence of apparent germ-line mutations, *Hum. Genet.*, 1998, vol. 102, no. 2, pp. 170–177.
17. Baumgartner-Parzer, S.M., Nowotny, P., Heinze, G., Waldhäusl, W., and Vierhapper, H., Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, vol. 90, no. 2, pp. 775–778.
18. Speiser, P.W., and White, P., Congenital adrenal hyperplasia New England, *J. Med.*, 2003, vol. 349, no. 8, pp. 776–788.
19. Charmandari, E., Eisenhofer, G., Mehlinger, S.L., Carlson, A., Wesley, R., Keil, M.F., Chrousos, G.P., New, M.I., and Merke, D.P., Adrenomedullary function may predict phenotype and genotype in classic 21-hydroxylase deficiency, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, vol. 87, no. 7, pp. 3031–3037.

Надійшла 09.11.15