

Нові молекулярно-генетичні чинники порушень розвитку статі

Л. А. Лівшиць¹, О. В. Городна¹, Д. А. Сіроха², К. О. Козирєва²,
Я. О. Вітренко³, Л. В. Тавокіна⁴, Г. Б. Лівшиць¹, Д. О. Микитенко⁵,
Н. Л. Погадаєва⁶, Н. Б. Зелінська⁷

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка

³ «Illumina channel partner» (IMG), Київ,

⁴ Клініка «Adonis Family», Київ

⁵ Клініка репродуктивної медицини «НАДІЯ», Київ

⁶ Національна дитяча спеціалізована лікарня МОЗ України «ОХМАТДИТ», Київ

⁷ Український науково-практичний центр ендокринної хірургії, трансплантації ендокринних органів і тканин МОЗ України, Київ

Порушення розвитку статі (disorders of sex development — DSD) — це численна група вроджених патологічних станів, для яких характерний атипичний розвиток хромосомної, гонадальної або анатомічної статі [1]. За різними даними літератури, частота DSD становить близько 1—2 випадки з 4500 народжень, тобто до 7,5 % від загальної кількості усіх вроджених аномалій розвитку [2]. У багатьох випадках DSD супроводжуються безпліддям та підвищеним ризиком раку сім'яників або яєчників. Ця група вроджених патологій становить складну проблему у педіатрії через труднощі клінічного ведення таких пацієнтів, що пов'язані з багатофакторним характером цих станів.

Гонадальний дисгенез — одна з найбільш поширених форм DSD, що виявляється широкою категорією порушень розвитку репродуктивної системи, які виникають на ранніх стадіях ембріогенезу. Наразі встановлено 80 відомих генів, залучених у патогенез DSD, у тому числі гонадального дисгенезу, а також понад 960 генів-кандидатів, які визначили на підставі даних аналізу профілю експресії генів на тваринних і клітинних моделях. Проте деякі нез'ясовані випадки гонадального дисгенезу можуть бути пов'язані з мутаціями нових генів, зв'язок яких із DSD наразі не підтверджений, або альтераціями генів, які впливають на регуляторні регіони, що призводить до їх нетипової експресії.

Мета роботи — вивчити молекулярно-генетичні чинники патогенезу порушень розвитку статі невідомої генетичної етіології у пацієнтів із різних регіонів України.

Матеріали та методи. У дослідження залучено 20 пацієнтів із клінічним діагнозом гонадального дисгенезу, які надали інформовану згоду на необхідні процедури. Потім за даними цитогенетичного та скринінгового молекулярно-генетичного досліджень провели відбір пацієнтів: 9 — з каріотипом XY SRY+, один пацієнт — XX SRY-, 3 пацієнти — зі структурними порушеннями Y-хромосоми. Окрім цього, залучено 8 пацієнтів із діагнозом синдрому повної або часткової нечутливості до андрогенів (каріотип XY SRY+).

Одним із критеріїв залучення у дослідження була відсутність за даними попереднього аналізу патогенних мутацій генів SRY, DMRT1, NR5A1, які є основними генетичними чинниками розвитку гонадального дисгенезу.

Цитогенетичні дослідження проводили на лімфоцитах периферичної крові з подальшим використанням стандартних протоколів хромосомного аналізу (GTG-зв'язування, FISH-CEP, LSI). Методом FISH із використанням локус-специфічних ДНК-зондів встановлено наявність локусу SRY, центромерного локусу DYZ3 (Yp11.1-q11.1) та локусу Yq12 довгого плеча (DYZ1).

Цитогеномні дослідження двох зразків ДНК пацієнтів проводили за допомогою MicrogenChip 60K Array-CGH.

Секвенування за Сенгером продуктів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), отриманих на матриці послідовності екзонів 5, 6, 7, 8 гена AR, проводили на аналізаторі IBA Prism 3100x (версія 3.1), повноекзомне секвенування (WES) — на Illumina HiSeq 4000

System. Картування зчитувань здійснювали відповідно до збірки GRCh37/hg19.

Біоінформаційний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення DRAGEN Germline Pipeline (Edico Genome, USA) та VarSeq (Golden Helix, USA).

Результати та обговорення. Серед когорти пацієнтів із DSD за даними молекулярно-цитогенетичного дослідження виявлено каріотип, до складу якого входять різні варіанти аберантної Y-хромосоми, які містять послідовність гена SRY: а). 47, X, psu idic(Y) (pter→q11.2:q11.2→pter),+mar. ish psu idic(Y) (p11.3-q11.2)(SRY++, DYZ3++); der(Y)(p11.1-q11.1) (DYZ3+); б). 46, X, der(Y)(p11.32). ish der(Y) (p11.3-q12) (SRY+, DYZ1++, DYZ3+); в). 46, X, psu idic(Y) (pter→q11.2:q11.2→pter). ish psu idic(Y)(p11.3-q11.2) (SRY++, DYZ1++, DYZ3+).

За результатами порівняльної повногеномної гібридизації (CGH-array) виявили: в одного пацієнта — дуплікацію ділянки на Y-хромосомі PAR1 (Yp11.32p11.2) x2, та делецію PAR2 (Yq12) x0; в іншого — делецію PAR1 (Yp11.32p11.2) x0.

Ми припускаємо, що найбільш функціонально значущі гени, такі як SRY, PPP2R3B, CRLF2, ZFY, RPS4Y1, TGIF2LY, що входять до складу дуплікації (1-й пацієнт) та делеції (2-й пацієнт) у локусі PAR1, можуть сприяти розвитку певних фенотипів DSD. Показано, що гени SRY, ZFY та CRLF2 беруть активну участь у розвитку гонад під час ембріогенезу, гени PPP2R3B та RPS4Y1 можуть зумовлювати розвиток синдромів Нунана і Тернера відповідно. Слід звернути увагу, що родини генів TSPY, FAM197Y і TTTY, які входять до складу виявлених CNV, транскрибуються в ячку та беруть участь у сперматогенезі.

За результатами поведеного аналізу можна зробити висновок про те, що гени, які входять до складу виявлених реорганізацій, є чутливими до дози та їхнє пошкодження є важливим молекулярно-генетичним чинником патогенезу DSD. У 5 пацієнтів (46, XY, SRY+) із синдромом повної нечутливості до андрогенів (CAIS) у результаті секвенування за Сенгером у гені рецептора до андрогенів (AR) виявлено раніше описану тільки в одному випадку сеймсенс-мутацію у 8-му екзоні X:67723745 C/T (GRCh38) та 4 міссенс-мутації: X:67721960 A/T у 6 екзоні та ще 3 у 7-му екзоні X:67722943 C>T (rs886041132), X:67722884 T>G, X:67722905 T>C (rs9332970) (hg38), які раніше не були описані як патогенні.

Для мутації X:67723745 C/T підтверджено можливість утворення криптичного донорного сайту сплайсингу та екзонного енхансеру. Для мутації X:67721960 A/T передбачено утворення екзонного сайленсеру сплайсингу. Що стосується EX-SKIP, то встановлено, що мутантний алель має вищу ймовірність пропуску екзону, ніж алель дикого типу. Виявлені мутації у 7-му екзоні зумовлюють заміни амінокислот у альфа-спіралі домену зв'язування білка AR з ядерним рецептором-коактиватором II типу (NCoA-2). Раніше визначені мутації у цьому домені асоційовані з розвитком синдрому нечутливості до андрогенів.

В одного пацієнта (46, XX, SRY-) виявлено *de novo* сеймсенс-мутацію гену пухлини Вільмса 1 (WT1) 11:032413528 T/C (GRCh37), яка раніше не була описана. Ця мутація генів зумовлює порушення сайту впізнавання для білка сплайсоми SRp40. Окрім цього, встановлено, що внаслідок цієї мутації відбувається активація криптичного донорного сайту сплайсингу та видалення послідовності інтронів 9-10 у мРНК-транскрипті, що спричиняє формування передчасного стоп-кодону і втрату 19 залишків амінокислот у ДНК-зв'язуючому домені білка WT1.

У 2 пацієнтів з каріотипом 46XY SRY+ та клінічним діагнозом гонадального дисгенезу виявлено патогенні мутації генів TYRO3 (заміна 15:41862801 G/T та інсерція 15:41865665 -/GTGGGCGTTCGG.) та STARD9 (заміна 15:42977290 C/T та делеція 15:42979360 AGCACA/-). Ці гени раніше не були визначені як гени кандидати патогенезу DSD [3].

Висновки. За результатами дослідження виявлено нові молекулярно-генетичні чинники патогенезу DSD, аналіз яких істотно покращить діагностику та створить підґрунтя для персоналізованого лікування цієї категорії пацієнтів.

Ключові слова: гени, мутація генів, порушення розвитку статі, аналіз послідовності нуклеотидів.

ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Blackless M, Charuvastra A, Derryck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K, Lee E. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis American Journal of Human Biology. 2000;12:151-166.
2. Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination—insights from humans and mice. Chromosome Research. 2012;20(1):215-238.
3. Eggers S et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. Genome Biology. 2016;17:243.