

УДК 61:575

**ИЗУЧЕНИЕ ВРОЖДЕННОЙ ДИСФУНКЦИИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ
В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

© А.А. Рахимкулова, В.Л. Ахметова, О.А. Малиевский, Э.К. Хуснутдинова

Одной из наиболее распространенных наследственных патологий является врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), обусловленная врожденными дефектами ферментов биосинтеза кортикостероидов. Более чем 90% случаев ВДКН связано с 21-гидроксилазной недостаточностью, степень которой определяет клинические проявления и тяжесть течения заболевания. В представленной работе проведен анализ гена *CYP21A2*, кодирующего фермент 21-гидроксилаза, у 120 больных ВДКН из Республики Башкортостан. В результате выявлено 11 мутаций в гене *CYP21A2*, среди которых с наибольшей частотой обнаружена делеция/конверсия *delA2orLGC* гена *CYP21A2* (29,16%). Мутации *I2splice*, *R356W*, *I172N*, *Q318X*, *V281L*, *P30L*, *R426C* и *F307+Int* гена *CYP21A2* идентифицированы с частотами от 14,58 до 0,4% соответственно. В 9 экзоне гена *CYP21A2* выявлена ранее неописанная делеция *delle384* гена *CYP21A2*. У 8 больных ВДКН обнаружено 4 кластера из двух мутаций на одной хромосоме: *Q318X+R356W*, *I172N+Q318X*, *delA2orLGC+V281L* и *I2splice+P453S*. Общая информативность изученных семей из РБ для прямой ДНК-диагностики ВДКН составила 73%. Установлено 100% соответствие фенотипа генотипу при мутациях, приводящих к частичному снижению активности 21-гидроксилазы. Полученные данные необходимо использовать для медико-генетического консультирования с целью повышения эффективности молекулярно-генетической диагностики ВДКН и профилактики рождения больных детей в РБ.

Ключевые слова: врожденная дисфункция коры надпочечников, 21-гидроксилаза, ген, *CYP21A2*, мутация.

Введение. Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) или адреногенитальный синдром (АГС) включает группу аутомно-рецессивных заболеваний, обусловленных врожденным дефектом ферментов биосинтеза кортикостероидов. В зависимости от дефицита фермента ВДКН классифицируют на несколько форм, из которых наиболее распространенной (90–95% всех случаев) показана недостаточность 21-гидроксилазы, участвующей в многоэтапном процессе синтеза минерало- и глюкокортикоидов в коре надпочечников и катализирующей трансформацию 17 α -гидроксиандростерона в 11-дезоксикортизол и прогестерона в 11-дезоксикорти-

костерон, которые через ряд последовательных реакций превращаются в кортизол и альдостерон соответственно [1–2]. Дефицит 21-гидроксилазы разнообразен по своим клиническим проявлениям и степени тяжести, вследствие чего выделяют классическую форму с выраженной недостаточностью фермента, основным признаком которой является внутриутробная вирилизация, и неклассическую форму (НФ) с умеренно выраженным ферментативным дефектом, проявляющуюся в постнатальном периоде [3]. Классический вариант заболевания подразделяют в свою очередь на сольтеряющую форму, которая характеризуется полным дефицитом фермента,

РАХИМКУЛОВА Айгуль Айратовна, Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,
e-mail: rahimkulova.aigul@mail.ru

АХМЕТОВА Вита Леоновна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: vita-akh@mail.ru

МАЛИЕВСКИЙ Олег Артурович – д.м.н., Башкирский государственный медицинский университет,
e-mail: malievsky@list.ru

ХУСНУТДИНОВА Эльза Камилевна – д.б.н., Институт биохимии и генетики УНЦ РАН,
e-mail: elzakh@mail.ru

проявляется нарушением солевого обмена с угрожающими жизни сольтеряющими кризами и может закончиться смертью ребенка в результате кардиогенного шока в возрасте 1–6 месяцев, и простую вирильную форму с прогрессирующей вирилизацией и ускоренным соматическим развитием. Частота встречаемости данного заболевания варьирует в довольно широких пределах: частота классической формы в мире составляет в среднем 1:15000–16000 новорожденных, в России – 1:8662, в Республике Башкортостан – 1:8974; неклассическая форма ВДКН встречается намного чаще – в среднем 1:1000 новорожденных, при этом наибольшая частота зафиксирована в популяции евреев Ашкенази, где она составляет 1:27 новорожденных [3–5].

Дефицит 21-гидроксилазы обусловлен мутациями в кодирующем его гене *CYP21A2*, локализованном на коротком плече 6 хромосомы в регионе главного комплекса гистосовместимости. В данном районе идентифицировано две высокогомологичные последовательности длиной около 30 kb: функционально активный ген *CYP21A2* и неактивный вследствие мутаций псевдоген *CYP21A1P*. Гомологичность данных генов достигает 98% в экзонных и 96% в интронных областях, что делает возможными события рекомбинации, являющиеся причиной возникновения более 90% мутаций активного гена *CYP21A2*, 75% из которых присутствуют в псевдогене и в результате микроконверсий, перенесенных на активный ген [5]. Оставшиеся 25% приходятся на делеции гена *CYP21A2* либо химерные конструкции *CYP21A1P/CYP21A2*. Около 5% мутаций этноспецифичны и не связаны с генными конверсиями [1].

Принимая во внимание актуальность медико-социальной проблемы недостаточности 21-гидроксилазы, важность пренатальной и сложность молекулярной диагностики данного заболевания, а также выраженную генетическую гетерогенность различных популяций мира по частоте и характеру мутаций гена *CYP21A2*, необходимо проводить молекулярные исследования данного гена в каждом отдельном регионе с последующим использо-

ванием полученных результатов в практике медико-генетического консультирования.

Цель настоящей работы заключалась в анализе гена *CYP21A2* у больных ВДКН из Республики Башкортостан и сопоставление идентифицированных мутаций с клиническими формами заболевания.

Материалы и методы. Молекулярно-генетический анализ гена *CYP21A2* был проведен у 120 больных ВДКН с клиническим диагнозом «врожденная дисфункция коры надпочечников», состоящих на учете в отделении эндокринологии в Республиканской детской клинической больнице г. Уфы и проживающих на территории Республики Башкортостан (РБ). Сольтеряющую форму (СТФ) имели 63 больных (52,5%), 45 – простую вирильную форму (ПФ) (37,5%), 12 – неклассическую форму (НФ) ВДКН (10%). У 87,2% больных также проанализированы образцы ДНК членов их семей (родителей, сибсов).

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

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 различных модификаций с последующим, при необходимости, рестрикционным анализом. Делецию около 30 kb (*delA2*) и большие генные конверсии (*LGC*) анализировали с помощью полуквантитативной ПЦР как одно мутационное повреждение *delA2/LGC*, не идентифицируя их отдельно, что возможно только с помощью блот-гибридизации по Саузерну. 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 исследуемых точковых мутаций, активного гена в псевдогене препятствуют 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-AATTAAGCCTCAATCCTCTGCAGCG) [6]. 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. Согласно литературным данным, *delA2/LGC* гена *CYP21A2*, как правило, ассоциирована с СТФ ВДКН [7]. В РБ данная мутация была обнаружена у 35 больных с СТФ, из них у 18 в гомозиготном состоянии, и 14 больных с ПФ заболевания, но только в компаунд-гетерозиготном состоянии с другой мутацией.

Вторая по частоте мутация *I2 splice* гена *CYP21A2*, характеризующаяся заменой аденина/цитозина на гуанин, приводящей к aberrantному сплайсингу первичных mRNA-транскриптов и сдвигу рамки считывания, обнаружена на 14,58% хромосом. Большинство гомозиготных носителей данной мутации имеют СТФ ВДКН [1], 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*) приводит к нарушению взаимодействия фермента 21-гидроксилаза с цитохромP450редуктазой, что блокирует электронный транспорт и процесс гидроксилирования. Данная мутация обнаружена на 11,7% хромосом у 22 больных с СТФ, 5 больных с ПФ и 1 больного с НФ ВДКН.

Мутация *p.Ile172Asn* гена *CYP21A2*, ведущая к синтезу фермента 21-гидроксилаза с 2%-й остаточной активностью, идентифицирована у 12 больных (5%) с ПФ ВДКН, тогда

как у больных с другими формами заболевания не выявлена, что соответствует литературным данным, согласно которым данная мутация ассоциирована с ПФ заболевания.

Результатом нонсенс-мутации *p.Gln318X*, обусловленной заменой С>Т в 1194 положении, приводящей к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона и, как следствие этого, к преждевременной терминации транскрипции, является синтез абсолютно нефункционального белка и развитие СТФ заболевания. В нашем исследовании данная мутация обнаружена на 3,3% хромосом, в том числе у 7 больных с СТФ и 1 больного с НФ ВДКН и только в компаунд-гетерозиготном состоянии с другими мутациями.

Мутация *p.Val281Leu* гена *CYP21A2* приводит к синтезу 21-гидроксилазы с 50%-й ферментативной активностью и ассоциирована, как правило, с НФ ВДКН. В РБ данная мутация также встречается только у больных с НФ заболевания с частотой 2,1%.

При мутации *p.Pro30Leu* гена *CYP21A2*, характерной для больных с НФ ВДКН, наблюдаются значительные внешние проявления избытка андрогенов. Нами данная мутация была обнаружена у 3 больных с ПФ заболевания (1,7%), причем у одного – в гомозиготном состоянии.

В результате проведенного SSCP-анализа промоторной области и 10 экзонов гена *CYP21A2* с последующим секвенированием образцов с измененной подвижностью однонитевых фрагментов у 4 больных идентифицировано 4 мутации, одна из которых (*delIle384*) ранее не описана. У 1 больного с ПФ 21-гидроксилазной недостаточности в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *I172N* обнаружена инсерция тимина в 1762 положении – *F307+1nt* (0,4%), приводящая к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к прекращению синтеза нормального белка 21-гидроксилазы. Мутация *p.Arg426Cys* гена *CYP21A2* была выявлена у одного больного с СТФ заболевания в компаунд-гетерозиготном состоянии с мутацией *I2splice* (0,4%). В результате данной мутации происходит замена аргинина на цистеин, которая приводит к образованию во-

дородных связей между аминокислотным остатком и пропионатной карбоксильной группой гема, изменяя ориентацию гема в белке и нарушая перенос электронов так, что белок полностью теряет свою функциональную активность [8]. Делеция *delle384* гена *CYP21A2* была идентифицирована у одного больного с СТФ заболевания. Данная ранее не описанная делеция трех нуклеотидов, приводящая к делеции изолейцина в 384 положении аминокислотной последовательности, была определена в компаунд-гетерозиготном состоянии с *delA2orLGC*.

Мутация *P453S*, замена пролина на серин в 453 положении, 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: *R356W+Q318X (2,1%)*, *delA2+V281L (0,4%)*, *I172N+Q318X (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 *CYP21A*, что, возможно, связано с большими конверсиями или многократными мутационными событиями.

Кроме того, в гене *CYP21A2* выявлены полиморфные варианты, наиболее распространенные из которых: *rs6462*, *rs6449*, *rs6474*, *S374S*. Все идентифицированные полиморфные варианты носят нейтральный характер и фенотипических проявлений не имеют.

Проведенный анализ корреляции фенотипа с генотипом у больных с недостаточностью 21-гидроксилазы из РБ показал, что при мутациях, полностью инактивирующих фермент, соответствие фенотипа генотипу составляет 90%, при мутациях, приводящих к 50–70% остаточной активности фермента, – 100%, а при мутациях, снижающих активность фермента до 2%, – 80%, что соответствует литературным данным [9].

Проведенное нами молекулярно-генетическое обследование 120 семей с ВДКН, проживающих в РБ, показало, что 66% изученных ВГКН семей оказались полностью инфор-

мативными для ДНК-диагностики прямым методом, 14% – частично информативными, 20% – абсолютно неинформативными. Во всех семьях при использовании прямой 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-генетической диагностики ВДКН в РБ в связи с ее высокой распространенностью в данном регионе и профилактики рождения больных детей.

Работа частично финансировалась грантами РФФИ № 12-04-97046-р_поволжье_а, ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы»: гос. контракт с Минобрнауки П601, договор №16.512.11.204 и соглашение № 14.В37.21.0111.

ЛИТЕРАТУРА

1. White Perrin C., Speiser Phyllis W. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency // *Endocrine Reviews*. 2000. Vol. 21, № 3. P. 245–291.
2. Zuzana Vrzalova, Zuzana Hrubá, Eva Hrabincová, Slavka Pouchla, Felix Votava, Stanislava Kolouskova, Lenka Fajkusova. Chimeric *CYP21A1P/CYO21A2* genes identified in Czech patients with congenital adrenal hyperplasia // *European Journal of Medical Genetics*. 2010. V. 54. P. 112–117.
3. Saroj Nimkarn, Karen Lin-Su, Maria I. New. Steroid 21 Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia // *Pediatr Clin*. 2011. № 58. P. 1281–1300.
4. Рамова З.Ф. Распространенность и клинико-диагностическая характеристика гипокортицизма у детей в Республике Башкортостан: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Уфа. 2010.
5. Haider Sh., Islam B., D'Atri V., Sgobba M., Poojari Ch., Sun L., Yuen T., Zaidi M. and New M. Structure-phenotype correlations of human *CYP21A2* mutations in congenital adrenal hyperplasia // *PNAS*. 2013. V. 110(7). P. 2605–2610.
6. Ilhem Ben Charfeddine, Felix G.Riepe, et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 50

Tunisian patients: Characterization of three novel polymorphisms. *Gene*. 2012. P. 20–26.

7. Fidevs Bas, Hulya Kayserili, et al. CYP21A2 Gene Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia: Genotype-phenotype correlation in Turkish children // *J. Clin Ped Endo*. 2009. № 1(3). P. 116–128.

8. Рахимкулова А.А., Ахметова В.Л., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетическое исследова-

ние врожденной дисфункции коры надпочечников в Республике Башкортостан // Тезисы Всероссийской молодежной научно-практической конференции / отв. ред. В.Ю. Гуськов. Уфа: РИЦ БашГУ, 2013. С. 214.

9. Maria I. New, Moollamanni Abraham, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *PNAS*, 2013.



STUDY OF CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA IN THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

© А.А. Rakhimkulova¹, V.L. Akhmetova¹, O.A. Malievsky², E.K. Khusnutdinova¹

¹Institute of biochemistry and genetics of RAS, ²Bashkir State University, Ufa, Russian Federation

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is one of the most common inherited disorders characterized by impaired secretion of cortisol due to a congenital defect of the enzymes responsible for the biosynthesis of steroid hormones. More than 90 percent of CAH are associated with 21-hydroxylase deficiency. This deficiency determines clinical symptoms and the severity of the disease. In the present study, we analyzed the *CYP21A2* gene that encodes the enzyme 21-hydroxylase in 120 patients with CAH from the Republic of Bashkortostan (RB). We identified 11 mutations of the *CYP21A2* gene. With the highest frequency we detected deletion/conversion of the *delA2orLGC CYP21A2* gene (29.16 pc). Mutations *I2splice*, *R356W*, *I172N*, *Q318X*, *V281L*, *P30L*, *R426C* and *F307+1nt* of the *CYP21A2* gene were identified with frequencies ranging from 14,58 to 0,4 pc, respectively. In the ninth exon of the *CYP21A2* gene we found a previously undescribed deletion *delle384* of the *CYP21A2* gene. Four clusters of two mutations on the same chromosome were found in 8 patients with CAH: *Q318X+R356W*, *I172N+Q318X*, *delA2orLGC+V281L* and *I2splice+P453S*. The summary informativeness of the CAH family studies in Bashkortostan for direct DNA diagnosis was 73 pc. We found a 100 pc compliance with phenotype-genotype mutations resulting in a partial reduction of the 21-hydroxylase activity. These data should be used for genetic counselling in order to increase the efficiency of molecular-genetic diagnosis and prevention of CAH-risk pregnancies.

Key words: congenital adrenal hyperplasia, 21-hydroxylase, *CYP21A2*.