

Идентификации двух мутаций в транс-положении в гене *CYP21A2* у плода без врожденной дисфункции коры надпочечников (ВДКН). Случай пренатальной диагностики

Осиновская Н.С., Султанов И.Ю.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия.
E-mail: natosinovskaya@mail.ru

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) является наследственным заболеванием с аутосомно-рецессивным типом наследования. В 95% случаев причиной являются мутации в гене *CYP21A2*, картированном на коротком плече хромосомы 6 в локусе 6p21.3. Целью работы было проведение пренатального исследования в семье X., имеющей ребёнка с сольтеряющей формой ВДКН. Для идентификации мутаций в гене *CYP21A2* и анализа полиморфизма гена *MICA* использовали метод ПЦР-ПДРФ анализа, для выявления количества копий гена — метод ПЦР в реальном времени. В образцах ДНК из ворсин хориона идентифицированы 2 разные мутации в гене *CYP21A2* и показано наличие одной «здоровой» копии этого гена, полученной от отца. По результатам генетического анализа сделан вывод об отсутствии ВДКН у плода. Исследование верифицировано после рождения.

Ключевые слова: ВДКН, *CYP21A2*, мутация, пренатальная диагностика.

Благодарность. Мы благодарим наших коллег из лаборатории пренатальной диагностики наследственных и врождённых болезней НИИАГиР им. Д.О. Отта Иващенко Т.Э. и Ефимову О.А. за помощь в оформлении статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Two *CYP21A2* mutations in trans-configuration were identified in the fetus without congenital adrenal hyperplasia (CAH). A case of prenatal diagnosis

Osinovskaya N.S., Sultanov I.Yu.

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia. E-mail: natosinovskaya@mail.ru

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive congenital disorder. *CYP21A2* gene mutations cause 95% of CAH cases. *CYP21A2* gene is located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3). Here, we present results of prenatal genetic analysis in a family X. with a child suffering by salt-wasting CAH form. *CYP21A2* mutations and *MICA* polymorphisms were identified by PCR-RFLP. Gene copy number was determined by real-time PCR. Two different *CYP21A2* mutations in trans-configuration along with a «healthy» gene copy, which was inherited from the father, were identified in the DNA samples from chorionic villi. We have concluded that the fetus has no CAH. The absence of CAH was confirmed after birth.

Key words: CAH, *CYP21A2*, mutation, prenatal diagnosis.

Введение

Врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН) - заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, в 95% случаев обусловлено мутациями в гене 21-гидроксилазы (*CYP21A2*). Ген картирован на коротком плече хромосомы 6 в локусе 6p21.3. Особенностью данного локуса является тандемное расположение гена *CYP21A2* и его псевдогена *CYP21A1P* [1, 2]. Высокая гомология этих генов приводит к ошибкам при конъюгации хромосом в мейозе, что является причиной образования различных типов перестроек: дупликаций, делеций, «химерных» генов. Данные события значительно осложняют процесс молекулярной диагностики ВДКН. Поэтому основой молекулярной диагностики недостаточности 21-гидроксилазы является применение

генспецифичных олигонуклеотидов с дальнейшей идентификацией мутаций в гене *CYP21A2*. Пренатальное тестирование ВДКН особенно важно при наличии в семье ребёнка с сольтеряющей или простой вирильной формой заболевания. По результатам молекулярно-генетического анализа возможно назначение адекватной терапии после рождения ребёнка.

Материал и методы

ДНК пробанда, матери и отца выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным способом [3]. ДНК плода выделяли из ворсин хориона, полученных при хорионбиопсии. Пробанд имеет сольтеряющую форму ВДКН. У матери и отца пробанда ВДКН отсутствует.

Мутации в гене 21-гидроксилазы определяли методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом.

Аmplификацию анализируемых фрагментов генов *CYP21A2* и *CYP21A1P* проводили в два этапа [4, 5]. Полученные на первом этапе продукты ПЦР использовали в качестве матрицы на втором этапе амплификации. При этом применяли специальные модифицированные праймеры для создания специфичных сайтов рестрикции с целью детекции изучаемых мутаций [4, 6].

Рестрикцию амплифицированных ДНК-фрагментов проводили в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя эндонуклеаз (ООО «Сибэнзим»). Последовательности олигонуклеотидов, условия реакций и эндонуклеазы рестрикции описаны в более ранних работах [6]. Определение аллелей гена *MICA* (HLA I класс) проводили методом ПЦР.

Для амплификации фрагментов ДНК использовали программируемый термоциклер МС2 фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Продукты амплификации и ферментативного гидролиза разделяли в 5–7,5% неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Гель окрашивали в водном растворе этидиум-бромида (0,5 мкг/мл). Результаты электрофоретического разделения фрагментов ДНК регистрировали в проходящем ультрафиолетовом свете (длина волны 380 нм) на трансиллюминатор Masovue (LKB, Великобритания).

Для определения дозы гена использовали систему детекции ПЦР-продукта с зондом TaqMan методом ПЦР в реальном времени. Зонды и праймеры были синтезированы компанией Синтол. РВ-ПЦР проводилась на приборе Rotorgene 3000 (Corbett Life Science, Австралия). Условия реакции и праймеры приведены в ранее опубликованных работах [7].

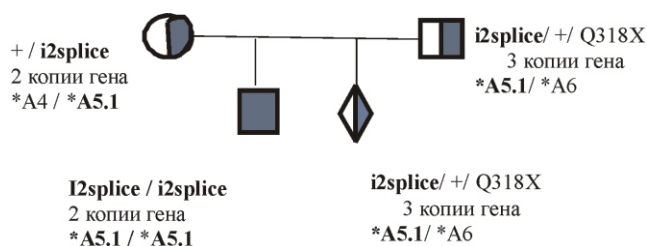


Рис. 1. Анализ мутаций в гене *CYP21A2* и полиморфизма гена *MICA* в семье, имеющей ребёнка с сольтеряющей формой ВДКН.

<i>i2splice</i> , *A5.1	<i>i2splice</i> , *A5.1	<i>i2splice</i> , *A5.1	<i>i2splice</i> , *A5.1
wt, *A4	wt, Q318X, *A6	<i>i2splice</i> , *A5.1	wt, Q318X *A6
Мать	Отец	Пробанд	Плод

Рис. 2. Схема наследования в семье X. Жирным курсивом обозначены гаплотипы с «нефункциональным» аллелем гена *CYP21A2*.

Результаты и обсуждение

В семье X., имеющей ребёнка с сольтеряющей формой ВДКН проведено пренатальное исследование на сроке 11 недель беременности. У пробанда при анализе мутаций в гене *CYP21A2* идентифицирована мутация *i2splice* (rs6467) в гомозиготном состоянии, что соответствовало установленному диагнозу. Следуя алгоритму молекулярной диагностики ВДКН, разработанному ранее [6], на 1-м этапе была проведена уточняющая диагностика мутаций в гене *CYP21A2* у обоих родителей. У матери выявлена мутация *i2splice* в гетерозиготном состоянии, у отца идентифицированы мутация *i2splice* в компаунде с мутацией Q318X (rs7755898). При определении количества копий гена *CYP21A2* методом ПЦР в реальном времени у отца пробанда определены 3 копии гена.

У плода идентифицированы мутация *i2splice* в компаунде с мутацией Q318X и методом ПЦР в реальном времени установлено наличие 3-х копий гена. Далее был проанализирован полиморфизм гена *MICA*, используемый как внегенный маркер при косвенной диагностике ВДКН. Полиморфизм в гене *MICA* представляет собой короткие tandemные GCT-повторы. В нем выделены аллели A4, A5, A5.1, A6, A9 [8]. Полученные результаты представлены на рис. 1.

На основе полученных данных составлена условная схема наследования мутаций в семье X. (рис. 2). Из схемы следует, что пробанд получил от матери хромосому с мутацией *i2splice* и аллелем *A5.1, от отца — хромосому с мутацией *i2splice* и аллелем *A5.1, тогда как плод от матери получил ту же хромосому, что и пробанд, а от отца — хромосому с мутацией Q318X, аллелем *A6 и дополнительной копией гена *CYP21A2*.

Исходя из проведённого анализа выявлено, что отец пробанда имеет на одной хромосоме мутацию в интроне 2 гена *CYP21A2* (*i2splice*), а на второй — мутацию в экзоне 8 (Q318X) в одном гене и вторую копию нормального гена. Такое же сочетание мутаций идентифицировано у плода. Следовательно, по гену *CYP21A2* генотип плода совпадает с генотипом отца пробанда. Результаты анализа полиморфизма гена *MICA* подтверждают наличие у плода хромосомы *i2splice*, *A 5.1, полученной от матери, такой же, как у пробанда, и отцовской хромосомы wt, Q318X *A6, отсутствующей у пробанда. По результатам молекулярно-генетического исследования плода сделан вывод об отсутствии у него ВДКН.

После рождения ребёнок был обследован и признан здоровым. Вероятно, основную функцию по синтезу белка взяла на себя дополнительная копия гена *CYP21A2* от отца, не несущая мутаций. Данное исследование доказывает необходимость при пренатальной диагностике ВДКН обязательного молекулярно-генетического обследования всей семьи (пробанд с ВДКН и оба родителя). Такой алгоритм пренатального исследования при высоком риске ВДКН позволяет избежать ложноположительных результатов.

Список литературы

1. White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83: 5111-5115.
2. Miller WL. Congenital adrenal hyperplasias. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1991; 20(4): 721-749.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001: 1-245.
4. Lee H, Chao H, Ng H, Choo K. Direct molecular diagnosis of CYP21 mutations in congenital adrenal hyperplasia. *J Med Genet*. 1996 May; 33: 371-375.
5. Bobba A, Iolascon A, Giannattasio S. et al. Characterisation of CAH alleles with non-radioactive DNA single strand conformation polymorphism analysis of the CYP21 gene. *J. Med. Genet*. 1997; 34(3): 223-228.
6. Осиновская НС. Особенности проведения молекулярной диагностики при врождённой гиперплазии коры надпочечников. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск, Альфа-Виста. 2002; (2): 111-119.
7. Малышева ОВ, Киселёв АВ, Осиновская НС. Применение метода ПЦР в реальном времени для молекулярно-генетической диагностики моногенных наследственных болезней. Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике. Новосибирск, АртЛайн. 2010; (14): 133-142.
8. Frigoul A, Lefranc M-P. MICA: Standardized IMGT allele nomenclature, polymorphisms and diseases. *Recent Res Devel Human Genet*. 2005; (3): 95-145.