

УДК 606:61, 602

# МЕТОДИКА АНАЛІЗУ МУТАЦІЙ ГЕНА *CYP21A2* У ХВОРИХ НА ВРОДЖЕНУ ГІПЕРПЛАЗІЮ КОРИ НАДНИРКОВИКІВ

С. Ю. Чернушин  
Л. А. Лівшиць

Інститут молекулярної біології і генетики  
НАН України, Київ

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Отримано 09.10.2013

Розроблено методику аналізу мутацій гена *CYP21A2*, придатну для пре- і постнатальної ДНК-діагностики різних типів вродженої гіперплазії кори наднирковиків та встановлення гетерозиготного носійства в родинах високого ризику.

Здійснено аналіз протяжної делеції гена *CYP21A2* і мутацій 655A/C>G, 999T>A, 1994C>T, 2108C>T, які призводять до вірильної та сільвтрачальної форм вродженої гіперплазії кори наднирковиків, а також мутацій 89C>T і 1683G>T, що спричинюють некласичну форму цього захворювання. Запропонована методика базується на аналізі алель-специфічної полімеразної ланцюгової реакції та поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.

Методика пройшла контроль якості на наявних зразках ДНК, що дає підстави запропонувати її для ДНК-діагностики (включаючи пренатальну) в родинах високого ризику, а також для аналізу гетерозиготних носіїв цього захворювання.

З використанням розробленої методики проведено аналіз мутацій семи хворим та їхнім батькам. У результаті виявлено 9 алелів з делецією гена *CYP21A2*, 4 — з мутацією 655A/C>G та 1 — з мутацією 2108C>T.

**Ключові слова:** вроджена гіперплазія кори наднирковиків, ензим 21-гідроксилаза, ген *CYP21A2*.

Вроджена гіперплазія кори наднирковиків (ВГКН), раніше відома як адреногенітальний синдром, — група спадкових захворювань, за яких порушується синтез кортизолу наднирковими залозами [1]. До ВГКН призводить дефіцит ензимів 21-гідроксилази, 11-бета-гідроксилази, 17-альфа-гідроксилази, стероїдогенного гострофазного регуляторного протеїну, 20-, 22-десмолази, які залучені до синтезу кортизолу.

Недостатність 21-гідроксилази є причиною більш ніж 90% випадків ВГКН. Це — аутосомно-рецесивне захворювання, до якого призводить наявність мутацій у гені *CYP21A2* [2]. На сьогодні ідентифіковано 181 мутацію цього гена [3]. Припускають, що частота носійства мутантного алеля гена *CYP21A2* становить 1 на 50 осіб у популяції здорового населення [4, 5].

Згідно з існуючою класифікацією мутації гена *CYP21A2* поділяють на чотири групи, виходячи зі встановленої *in vitro* залишкової активності ензиму 21-гідроксилази [4]. До групи «0» включають делецію гена *CYP21A2* та мутації 707\_714delGAGACTAC,

E6cluster, 1762\_1763insT, 1994C>T, 2108C>T, що призводять до повної відсутності ензиму, до групи «А» — мутацію 655A/C>G, за якої спостерігають залишкову активність ензиму. До групи «В» відносять мутацію 999T>A, за якої активність ензиму дорівнює не більше 10% від норми, до групи «С» — мутації 89C>T, 1683G>T, 2578C>T, за яких активність ензиму становить 10–75% від норми. Показано, що саме мутації групи «С» призводять до розвитку некласичної форми ВГКН [6, 7].

Ген *CYP21A2* та псевдоген *CYP21A1P* локалізовані в регіоні HLA класу III, що розташований у хромосомній ділянці 6p21.3. Псевдоген *CYP21A1P* містить мутації, які унеможливають експресію функціонального ензиму 21-гідроксилази [8].

Слід зазначити, що псевдоген *CYP21A1P* на 98% гомологічний до кодувальної послідовності гена *CYP21A2* і на 96% — до некодувальної [8].

Метою роботи було розроблення методики аналізу мутацій гена *CYP21A2* (655A/C>G, 999T>A, 1994C>T, 2108C>T, 89 C>T,

1683G>T), придатної для пре- і постнатальної ДНК-діагностики різних типів ВГКН, та встановлення гетерозиготного носійства в родинях високого ризику.

### Матеріали і методи

Зразки геномної ДНК людини виділяли з лейкоцитів периферійної крові й очищали з використанням стандартної методики фенольно-хлороформної екстракції [9]. Згідно з основними нормами біоетики за використання людини як об'єкта дослідження інформовану згоду на його проведення було одержано від усіх досліджуваних індивідів.

Нами здійснено дизайн і синтез специфічних праймерів і оптимізовано умови полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для аналізу протяжної делеції/конверсії гена *CYP21A2* та мутацій 89С>Т, 655А/С>G, 999Т>А, 2108С>Т — методом алель-специфічної ПЛР, а також мутацій 1683G>Т, 1994С>Т — методом аналізу поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів.

ПЛР проводили в автоматичному режимі на ампліфікаторі 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США) з використанням Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Литва).

Реакцію виконували в такому режимі:

- денатурація 94 °С — 7 хв;
- 94 °С — 30 с, 66 °С — 0,4 °С кожен 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 кожен цикл — 20 циклів;
- фінальна елонгація — 15 хв.

Реакційна суміш об'ємом 15 мкл складалася з: 1X Long PCR Buffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, по

300 мкМ кожного трифосфату, олігонуклеотиди — 10 мМ, BSA — 2 мкг/мл, 1 од. активності Long PCR Enzyme Mix (Fermentas), бетаїн — 1 М.

Бетаїн додавали до суміші через його властивість підвищувати стабільність полімерази, що є актуальним за такого тривалого часу елонгації. Також бетаїн здатен нівелювати різницю в температурах плавлення пар А-Т та G-С, що допомагає запобігти передчасній ренатурації ДНК під час відпалення праймерів та елонгації [10].

### Результати та обговорення

Для здійснення аналізу мутацій досліджуваного гена розроблено схему диференціальної ампліфікації *in vitro* послідовності гена *CYP21A2* і псевдогена *CYP21A1P*. Для цього проводили ампліфікацію *in vitro* за допомогою ПЛР-фрагмента завдовжки 8,5 т. п. н., до складу якого входять:

- а) послідовність із 31-го інтрона до 3'-кінця гена *TNXB*;
- б) повна послідовність гена *CYP21A2* (рис. 1).

Необхідність дизайну праймера *TNXB32F*, гомологічного саме послідовності 31-го інтрона гена *TNXB*, зумовлена наявністю в геномі псевдогена *XA*, який є високогомологічним послідовності від 32-го екзона до 3'-кінця гена *TNXB* і міститься у безпосе-

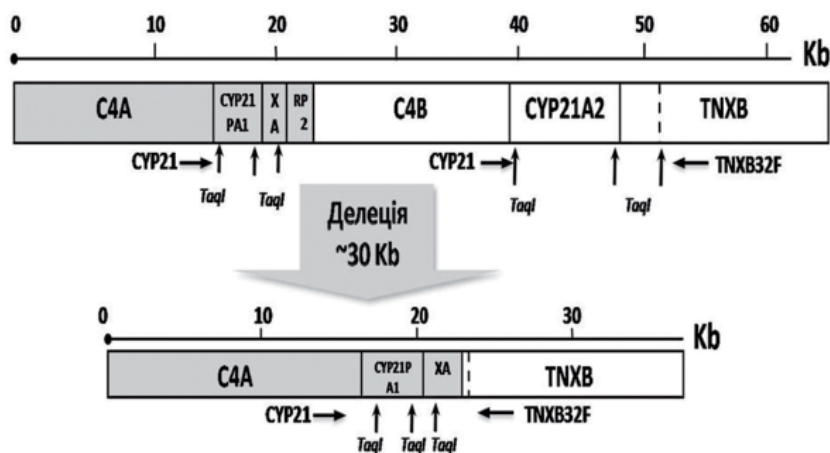


Рис 1. Схематичне зображення хромосомної ділянки 6p21.3.

Сірим кольором позначено псевдогени, білим — гени. Пунктиром показано зону дуплікації гена *XA* у гені *TNXB*. Праймери *TNXB32F* та *CYP21-3'* фланкують фрагмент завдовжки 8,5 т. п. н., який включає гени *TNXB* та *CYP21A2*. У разі делеції за наявності генів *CYP21A2*, *C4B*, *RP2*, *XA* фрагмент завдовжки 8,5 т. п. н. охоплюватиме ген *TNXB* та псевдоген *CYP21A1P*

редній близькості до псевдогена *CYP21A1P*. Саме цим пояснюється така велика протяжність досліджуваного фрагмента.

У разі відсутності делеції гена *CYP21A2* одержаний фрагмент 8,5 т. п. н. можна використовувати як матрицю для подальшого аналізу інших мутацій цього гена. Це уможлиблює одержання ампліфікованої ДНК-матриці, що не містить помилок. Із цією метою було використано набір Long PCR Enzyme Mix (Fermentas, Литва), оскільки він забезпечує у 3 рази вищу точність синтезу, ніж звичайна Taq ДНК-полімераза завдяки вмісту в використаній суміші термостабільної ДНК-полімерази високої точності з 3'-5'екзонуклеазною активністю. Ампліфікаційний буфер із цього набору розроблено спеціально для запобігання депуринізації, що додатково зменшує вірогідність виникнення помилок в ампліфікованій послідовності.

Гетерозиготне носійство делеції гена *CYP21A2* виключає можливість використання ампліфікованого фрагмента 8,5 т. п. н. як матриці для подальшого аналізу, оскільки в такому разі він міститиме ще й послідовність псевдогена *CYP21A1P* із гомологічної хромосоми. У цьому випадку для одержання ампліфікованої ДНК-матриці використовували праймери, описані раніше [11].

Для аналізу мутацій 89 С>Т, 655 А/С>G, 999 Т>А та 2108 С>Т розроблено метод алель-специфічної ПЛР із застосуванням системи із 3 праймерів, один з яких є спільним для ампліфікації як нормального так і мутантного варіантів, а два інших гомологічні «диному» та мутантному алелям за рахунок специфічності 3'-кінцевого нуклеотида. Оскільки у разі мутації 655 А/С>G нормальними є одразу два варіанти — А та

С, ми використовували систему із 4 праймерів, із яких 2 праймери гомологічні нормальним варіантам, один — мутантному варіанту і один є спільним для ампліфікації усіх трьох варіантів (рис. 2).

З метою аналізу мутації 1683G>Т розроблено метод поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів для ендонуклеази рестрикції *PmlI*. Після гідролізу ампліфікованого фрагмента 633 п. н. ендонуклеазою рестрикції *PmlI* за наявності заміни 1683G>Т зникає єдиний у даній послідовності сайт упізнання для ендонуклеази, за відсутності заміни 1683G>Т утворюються фрагменти 502 п. н. та 133 п. н.

Мутацію 1994С>Т аналізували раніше описаним методом [11].

Методику апробовано на контрольних зразках із мутаціями 89 С>Т, 655 А/С>G, 999 Т>А, 1683G>Т, 1994С>Т гена *CYP21A2* та делецією гена *CYP21A2*, люб'язно наданими професором В. С. Барановим (Інститут акушерства і гінекології ім. Д. О. Отта РАМН, Санкт-Петербург, Росія) та професором О. В. Поляковим (Медико-генетичний науковий центр РАМН, Москва, Росія).

Із застосуванням розробленої методики аналіз мутацій проведено семи хворим на ВГКН та їхнім батькам. У результаті виявлено 9 алелів з делецією гена *CYP21A2*, 4 — з мутацією 655 А/С>G та 1 алель з мутацією 2108С>Т.

Після оброблення ампліфікованого фрагмента 8,5 т. п. н. ендонуклеазою рестрикції *TaqI* амплікон послідовності гена *CYP21A2* виявляють як фрагмент 3,7 т. п. н., амплікон псевдогена *CYP21A1P* — 3,2 т. п. н., гена *TNXB* — 2,4 т. п. н. (рис. 3). Відсутність фрагмента 3,7 т. п. н. свідчить про наявність

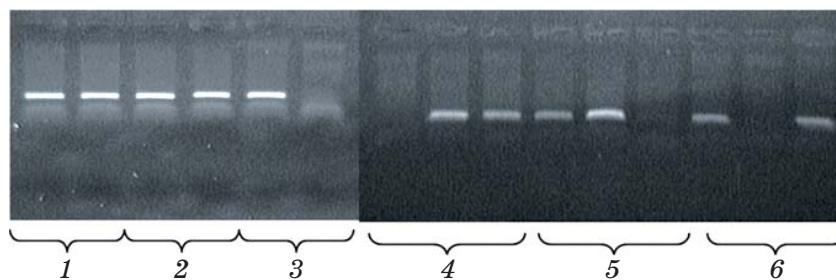


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР 2-інтрона гена та 8-ексона гена *CYP21A2* з використанням методу алель-специфічної ПЛР для детекції мутації 655А/С>G та 2108 С>Т в 1,5%-му агарозному гелі:

- 1 — зразок з генотипом 2108 СТ;
- 2 — зразок з генотипом 2108 СТ;
- 3 — зразок з генотипом 2108 СС;
- 4 — зразок з генотипом 655 СG;
- 5 — зразок з генотипом 655 АС;
- 6 — зразок з генотипом 655 АG

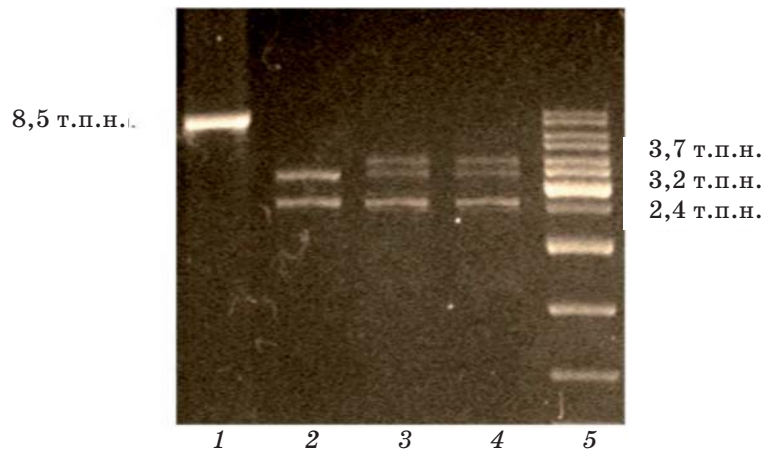


Рис. 3. Електрофореграма гідролізованих продуктів ПЛР ділянки гена *CYP21A2*, що утворились після гідролізу специфічною ендонуклеазою рестрикції *TaqI* в 1,2%-му агарозному гелі:

- 1 — негідролізований фрагмент 8,5 кб;
- 2 — пробанд з гомозиготною делецією гена *CYP21A2*;
- 3 — плід-носій делеції гена *CYP21A2*;
- 4 — мати-носій делеції гена *CYP21A2*;
- 5 — маркер розміру фрагментів ДНК (100–10 000 п. н.)

гомозиготної делеції саме гена *CYP21A2*, з другого боку — наявність фрагментів 3,7 т. п. н. та 3,2 т. п. н. вказує на наявність цієї делеції в гетерозиготному стані.

Надалі планується розширювати спектр досліджуваних мутацій гена *CYP21A2*, що призводять до різних форм захворювання на ВГКН.

Таким чином, розроблено методику аналізу протяжної делеції гена *CYP21A2* та мутацій 655 А/С>G, 999Т>А, 1994С>Т, 2108С>Т цього гена, які спричинюють вірільну і силь-

втрачаючу форми ВГКН, а також мутацій 89 С>Т та 1683G>Т, які призводять до не-класичної форми ВГКН.

Методика пройшла контроль якості на зразках ДНК з мутаціями 89 С>Т, 655 А/С>G, 999 Т>А, 1683G>Т, 1994С>Т гена *CYP21A2* та делецією гена *CYP21A2*, що дає підстави запропонувати її для ДНК-діагностики (включаючи пренатальну) в родинах високого ризику ВГКН, а також для аналізу гетерозиготних носіїв цього захворювання.

## REFERENCES

1. Merke D. P., Bornstein S. R. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2005, V. 365, 2125–2136.
2. Levine L. S. Congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr. Rev.* 2000, V. 21, 159–170.
3. Ingelman-Sundberg M., Daly A. K., Nebert D. W., Sim S. C. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. Available at <http://www.cypalleles.ki.se/>
4. Baumgartner-Parzer S. M., Nowotny P., Heinze G., Waldhäusl W., Vierhapper H. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, V. 90, 775–778.
5. New M. I. Extensive clinical experience: non-classical 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006, V. 91, 4205–4214.
6. Speiser P. W., White P. Congenital adrenal hyperplasia, *New Eng. J. Med.* 2003, V. 349, 776–788.
7. Charmandari E., Eisenhofer G., Mehlinger S. L., Carlson A., Wesley R., Keil M. F., Chrousos G. P., New M. I., Merke D. P. Adrenomedullary function may predict phenotype and genotype in classic 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2002, V. 87, 3031–3037.
8. Haider S., Islam B., D'Atri V., Sgobba M., Poojari C., Sun L., Yuen T., Zaidi M., New M. I. Structure-phenotype correlations of human *CYP21A2* mutations in congenital adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013, V. 110, 2605–2610.
9. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*. 1982, 265.

10. Vasudevamurthy M. K., Lever M., George P. M., Morison K. R. Betaine structure and the presence of hydroxyl groups alters the effects on DNA melting temperatures. *Biopolymers*. 2009, V. 91, 85–94.
11. Stikkelbroeck N. M., Hoefsloot L. H., de Wijs I. J., Otten B. J., Hermus A. R., Siskerman 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, V. 88, 3835–3859.

## МЕТОДИКА АНАЛИЗА МУТАЦИЙ ГЕНА CYP21A2 У БОЛЬНЫХ С ВРОЖДЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ

С. Ю. Чернушин  
Л. А. Лившиц

Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

E-mail: livshits@imbg.org.ua

Разработана методика анализа мутаций гена *CYP21A2*, пригодная для пре- и постнатальной ДНК-диагностики различных типов врожденной гиперплазии коры надпочечников и установления гетерозиготного носительства в семьях высокого риска.

Осуществлен анализ протяженной делеции гена *CYP21A2* и мутаций 655A/C>G, 999T>A, 1994C>T, 2108C>T, которые приводят к вирильной и сольтеряющей формам врожденной гиперплазии коры надпочечников, а также мутациям 89C>T и 1683G>T, обуславливающим неклассическую форму этого заболевания. Предложенная методика базируется на анализе аллель-специфической полимеразной цепной реакции и полиморфизма длины рестрикционных фрагментов.

Методика прошла контроль качества на имеющихся образцах ДНК, что дает основание предложить ее для ДНК-диагностики (включая пренатальную) в семьях высокого риска, а также для анализа гетерозиготных носителей данного заболевания.

С использованием разработанной методики проведен анализ мутаций семи больным и их родителям. В результате выявлено 9 аллелей с делецией гена *CYP21A2*, 4 — с мутацией 655A/C>G и 1 — с мутацией 2108C>T.

**Ключевые слова:** врожденная гиперплазия коры надпочечников, фермент 21-гидроксилаза, ген *CYP21A2*.

## ANALYSIS CYP21A2 GENE MUTATIONS TECHNIQUE IN PATIENTS WITH CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA

S. Yu. Chernushyn, L. A. Livshits

Institute of Molecular Biology and Genetics of  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv,  
Ukraine

E-mail: livshits@imbg.org.ua

The technique of *CYP21A2* gene mutation analysis, which can be applicable for pre- and postnatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia various types was developed.

The analysis of extended *CYP21A2* gene deletions and mutations 655A/C>G, 999T>A, 1994C>T, 2108C>T, which lead to congenital adrenal hyperplasia simple virilizing and salt wasting forms, and mutations 89C>T and 1683G>T, which lead to non-classical forms of the illness was proposed. This technique is based on analysis of the allele specific polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism.

The technique has passed quality control on available DNA samples. Thus this may be suggested for DNA diagnostics (including prenatal) in high-risk families and for analysis of heterozygous carriers illness. Using the developed technique nine alleles with *CYP21A2* gene deletion, 4 alleles with 655A/C>G mutation and 1 allele with 2108C>T mutation were detected in seven patients and their parents.

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