

МУТАЦІЇ В ГЕНІ АНДРОГЕНОВОГО РЕЦЕПТОРУ У ПАЦІЄНТІВ ЗІ СИНДРОМОМ НЕЧУТЛИВОСТІ ДО АНДРОГЕНІВ

Сіроха Д.А.

*Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка*

Науковий керівник – Лівшиць Л.А., доктор біологічних наук, професорка
Навчально-наукового центра «Інститут біології та медицини»
Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Синдром нечутливості до андрогенів (СНА, Androgen insensitivity syndrome, AIS) – найпоширеніше порушення розвитку статі (ППС, Disorder of sex development, DSD) у людей з каріотипом 46, XY [Galani, 2008]. Мутації в гені AR (Androgen receptor, андрогеновий рецептор) зустрічаються у більшості людей зі СНА. Екзони 4-8, які кодують ліганд зв'язуючий домен (LBD, ligand binding domain) є, так званими, гарячими точками мутацій.

Метою цього дослідження був пошук мутацій у послідовності екзонів 6-8, які кодують ліганд зв'язуючий домен гена AR у пацієнтів з різними клінічними фенотипами СНА з України.

Обстежуваними пацієнтами були 4 жінки з каріотипом 46,XY, SRY+ та клінічними фенотипами СНА (2 – СПНА (синдром повної нечутливості до андрогенів, CAIS, complete androgen insensitivity syndrome), 2 – СЧНА (синдром часткової нечутливості до андрогенів, PAIS, partial androgen insensitivity syndrome).

Рівень тестостерону (Т), лютеїнізуючого гормону (ЛГ) та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) у сироватці крові кількісно визначали за допомогою електрохімілюмінесцентного імуноферментного аналізу (ECLIA). Цитогенетичні дослідження були проведені на лімфоцитах периферійної крові з подальшим використанням стандартних протоколів хромосомного аналізу (GTG). Наявність послідовності SRY було підтверджено FISH за допомогою зонда LSI SRY.

Пряме секвенування 6-8 екзонів за Сангером проводили у пацієнтів та членів сім'ї на продуктах ПЛР на матриці зразків ДНК, виділених з лімфоцитів периферійної крові.

Виявлені SNP аналізували за допомогою біоінформаційних ресурсів gnomAD, VEP, MutationTaster, Human Splicing Finder, NetPhorest 2.1, Group-based Prediction System 5.0 та PhosphoPICK [Desmet, 2009].

Моделювання мутантних білків на основі доступних тривимірних моделей проводилося за допомогою програмного забезпечення з відкритим кодом UCSF Chimera 1.14rc [Pettersen, 2004].

Було виявлено 3 описані раніше мутації (міссенс мутація X:67722905 T>C (rs9332970) у пацієнтки зі СЧНА, міссенс мутація X:67722943 C>T (rs886041132) у пацієнтки зі СПНА та сеймсенс мутація X:67723745 C>T

(rs137852594) у пацієнтки зі СЧНА). Координати надано згідно збірки геному GRCh38. Ці мутації було визначено як патогенні за допомогою SIFT, PolyPhen, MutationTaster, Human Splicing Finder [Sim, 2012], [Ramensky, 2002], [Schwarz, 2014]. Крім того, синонімічна мутація X:67723745 C>T (rs137852594), виявлена у пацієнта з ПАІС, визначалася як мутація, що впливає на процеси сплайсингу [Audi, 2010], [Hellwinkel, 2001], [Batista, 2017].

У цьому дослідженні було виявлено нову мутацію X:67722884 T>G у пацієнтки та членів сім'ї зі СПНА. Ця мутація прогнозується як патогенна за допомогою вищезазначених біоінформаційних засобів. Розрахунки зміни стабільності білка, спричинені точковою мутацією, за допомогою ресурсу STRUM показали дестабілізуючий ефект заміни Ile836Ser у $\Delta\Delta G = -2,6$ [Quan, 2016]. Можливий аналіз аберантного фосфорилування виявив здатність сімейства кіназ MAPK, сімейства кіназ Akt, кіназ CDK1, CDK7, CDK9, PKC до фосфорилування Ser836.

Результати щодо патогенності мутацій X:67722905 T>C (rs9332970), X:67722943 C>T (rs886041132), X:67723745 C>T (rs137852594), виявлених у хворих на СНА з України, отриманих за допомогою біоінформаційних ресурсів SIFT, PolyPhen, MutationTaster, Human Splicing Finder співвідносяться з раніше опублікованими даними щодо слабшого зв'язування андрогенів у пацієнтів з такими ж мутаціями. Це підтверджує інформативність використання таких ресурсів для аналізу патогенності мутації.

Аналіз ортологічних білків, субдоменної структури та аберантного фосфорилування AR-LBD свідчить про те, що нова мутація X:67722884 T>G є патогенною. На основі аналізу моделювання мутантного білка з подальшою оцінкою зміни вільної енергії за допомогою STRUM було передбачено, що мутантний білок зв'язує андрогени в 460 разів гірше, ніж дикий тип [Tahiri, 2001].

Список використаних джерел:

1. Audi L, Fernández-Cancio M, Carrascosa A, et al. Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010. 95(4):1876–1888.
2. Batista RL, Rodrigues ADS, Nishi MY, et al. A recurrent synonymous mutation in the human androgen receptor gene causing complete androgen insensitivity syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017. 174:14–16.
3. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009. 37(9):e67.
4. Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A. Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones (Athens).* 2008. 7(3):217–229.
5. Hellwinkel OJ, Holterhus PM, Struve D, Marschke C, Homburg N, Hiort O. A unique exonic splicing mutation in the human androgen receptor gene indicates a physiologic relevance of regular androgen receptor transcript variants. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001. 86(6):2569–2575.

6. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004. 25(13):1605–1612.
7. Quan L, Lv Q, Zhang Y. STRUM: structure-based prediction of protein stability changes upon single-point mutation. *Bioinformatics*. 2016. 32(19):2936–2946.
8. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002. 30(17):3894–3900.
9. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014. 11(4):361–362.
10. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res*. 2012. 40(Web Server issue):W452–W457
11. Tahiri B, Auzou G, Nicolas JC, Sultan C, Lupo B. Participation of critical residues from the extreme C-terminal end of the human androgen receptor in the ligand binding function. *Biochemistry*. 2001. 40(29):8431–8437