

Дефект стероидогенного фактора 1 (SF1) как причина нарушения формирования пола 46XY (первое описание в отечественной литературе)

К.м.н. Н.Ю. КАЛИНЧЕНКО^{1*}, к.м.н. Т.А. АНОСОВА², к.м.н. В.А. ИОУТСИ¹, д.м.н. А.Н. ТЮЛЬПАКОВ¹

¹ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия; ²ГБУЗ «Детская городская поликлиника №125» ДЗМ, Москва, Россия

Стероидогенный фактор 1 (SF1/AdBP4/FTZF1, NR5A1) — фактор транскрипции, регулирующий процессы закладки и развития стероидогенных органов. Классический фенотип при дефектах фактора SF1, встречающийся при наличии гомозиготных и ряда гетерозиготных мутаций в гене NR5A1, представляет собой первичную надпочечниковую недостаточность в сочетании с дисгенезией гонад при кариотипе 46XY. Однако большинство случаев гетерозиготных мутаций в гене NR5A1 характеризуются нарушением половой дифференцировки без признаков надпочечниковой недостаточности. В данной публикации впервые в России представлено описание случая нарушения формирования пола 46XY, обусловленного гетерозиготной мутацией в гене NR5A1. Методом молекулярно-генетического анализа была обнаружена ранее неизвестная мутация в лиганд-связывающем домене SF1 (с.951delC p.H317QfsX17). Данный клинический пример подчеркивает необходимость обследования мальчиков с тяжелыми формами гипоспадии на наличие мутаций в гене NR5A1.

Ключевые слова: стероидогенный фактор (SF1), NR5A1, нарушение половой дифференцировки, молекулярно-генетический анализ

The first clinical presentation of disorders of sex development 46 XY due to mutation in Steroidogenic factor 1 (SF1) in Russian Literature

N.YU. KALINCHENKO, T.A. ANOSOVA, V.A. IOUTSI, A.N. TIULPAKOV

¹Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia; ²Moscow Pediatric clinic №125, Moscow, Russia

Steroidogenic factor 1 (SF1/AdBP4/FTZF1, NR5A1) is a nuclear receptor transcription factor that plays a critical role in different processes of sex development. Homozygous mutations in SF1 result in adrenal failure and complete testicular dysgenesis in 46,XY individuals. According to recent studies heterozygous mutations in SF1 are associated with milder phenotype: they are found in children with 46,XY disorders of sex development (DSD) but with apparently normal adrenal structure and function. Here we present for the first time in Russian literature a case of SF1 deficiency. Molecular genetic analysis of NR5A1 gene revealed a novel heterozygous mutation c.951delC p.H317QfsX17. This clinical case demonstrates the importance of molecular genetic studies in DSD 46,XY, especially severe forms.

Keywords: steroidogenic factor-1 (SF1), NR5A1, disorders of sex development (DSD), molecular genetic analysis.

doi: 10.14341/probl20166215-59

Нарушения формирования пола (НФП) — это группа врожденных патологических состояний, обусловленных дефектами закладки хромосомного, гонадного и/или фенотипического пола. В настоящее время в данную группу объединены заболевания с высокой клинической вариабельностью и генетической гетерогенностью.

Согласно современным представлениям, начальные этапы формирования пола контролируются последовательной активацией/деактивацией ряда транскрипционных факторов, и нарушение на любом из этих этапов будет приводить к НФП. К числу таких транскрипционных факторов, запускающих и контролирующих процесс формирования гонад, относится и стероидогенный фактор 1 (SF1), кодируемый геном NR5A1.

Стероидогенный фактор 1 (SF1; NR5A1; Ad4BP; FTZF1) — это фактор транскрипции, участвующий в процессах закладки и развития надпочечников, гонад и вентромедиального ядра гипоталамуса. Он

является регулятором транскрипции целого ряда белков, участвующих в дифференцировке мужских гонад, включая SOX9 и AMG. Он также модулирует экспрессию белков, участвующих в стероидогенезе, таких как STAR и некоторые цитохром-P450-ассоциированные гидроксилазы [1–3].

Фенотип дефекта SF1 впервые был описан в 1995 г. у трансгенных мышей с нокаутированным геном FTZF1 (аналог человеческого гена NR5A1) и характеризовался первичной надпочечниковой недостаточностью, дисгенезией гонад с женским фенотипом при кариотипе 46XY и персистенцией производных мюллеровых протоков [4]. Первое описание мутации в гене NR5A1 у человека опубликовано в 1999 г. Гетерозиготная мутация G35E была выявлена у фенотипической девочки с кариотипом 46XY, у которой проявления НФП (рудиментарная матка, располагающиеся интраабдоминально стрекоподобные тестикулы) сочетались с первичной надпочечниковой недостаточностью, манифестировав-

шей при рождении [1]. Позднее появились описания так называемых «стертых» форм дефектов SF1, при которых отмечалось НФП 46XY без признаков надпочечниковой недостаточности [5–7].

До настоящего времени в отечественной литературе отсутствуют описания пациентов с НФП 46XY, обусловленными дефектами SF1. Мы впервые в России описываем случай семейной формы гипоспадии, ассоциированный с неизвестной ранее гетерозиготной мутацией в гене *NR5A1*.

Медицинские данные представлены в деперсонализированном виде с письменного согласия пациента.

Описание клинического случая

В отделении наследственных эндокринопатий ФГУ ЭНЦ направлен больной А., с целью уточнения причины семейного варианта НФП.

Пробанд от первой, нормально протекавшей беременности, срочных родов, масса при рождении 3800 г, длина тела 52 см. Семейный анамнез по половой патологии отягощен: у младшего брата — мошоночная форма гипоспадии (оперирован 4 раза), левосторонний крипторхизм; у дяди по материнской линии — односторонний крипторхизм (оперирован).

С рождения у пробанда отмечено неправильное строение наружных гениталий: мошоночная форма гипоспадии, двусторонний крипторхизм, паховая форма. По поводу гипоспадии был оперирован в 2,8 года, 3,5 года, 5 и 12 лет. В 2,5 года произведена орхипексия справа. По поводу левостороннего крипторхизма в возрасте 4,5–6,6 года получил несколько курсов ХГЧ, на фоне которых эффекта отмечено не было. В 8 лет произведена орхипексия слева.

Физикальное обследование

При обследовании в 18 лет: рост 184,0 см (SDS роста=1,4), масса тела 113,5 кг (SDS ИМТ=3,0). Телосложение пропорциональное; по органам и системам — без особенностей. Половые органы: состояние после 4 этапов мускулинизирующей пластики, половой член 9 см, кавернозные тела развиты хорошо. Половое развитие Таннер G4P4, яички в мошонке, D=S=12 мл, гинекомастии не выявлено.

Лабораторно-инструментальное обследование

Гормональный анализ крови: ЛГ — 6,9 Ед/л (норма 2,2–11,1), ФСГ — 9,6 Ед/л (норма 1,6–9,7), уровень тестостерона на нижней границы возрастной нормы (11,8 нмоль/л) (норма 11–22). По результатам мультитероидного анализа данных за нарушения стероидогенеза нет. Определение ЛГ и ФСГ проводилось на системе VITROS.

В ходе стимуляционной пробы с АКТГ пролонгированного действия получен адекватный подъем кортизола до 1276 нмоль/л, что позволило исклю-

чить надпочечниковую недостаточность. При стимуляционной пробе с чХГ получен адекватный подъем тестостерона, нормальное соотношение тестостерона и андростендиона, что исключало дефицит 17 β -гидроксистероиддегидрогеназы (табл. 1). Тестостерон, 21-дезоксикортизол, 17-ОН прегненолон, 17-ОН прогестерон, кортикостерон, прогестерон, 11-дезоксикортизол до и после стимуляции чХГ (3000 Ед/сутки 3 дня) и синактеном-депо (250 мг внутримышечно) определяли с помощью высокопроизводительной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС) [8].

При УЗИ надпочечников патологии выявлено не было. УЗИ яичек обнаружило уменьшение их размеров: правое — 2,9×1,4×1,7 см, левое — 3,2×1,6×1,7 см.

Семейный вариант НФП 46XY, отсутствие клинических признаков нечувствительности к андрогенам, а также результаты мультитероидного анализа, исключающие какой-либо дефект биосинтеза тестостерона, позволили рассматривать дефект SF1 как одну из вероятных причин заболевания.

Генетические исследования

Геномную ДНК выделяли из периферических лейкоцитов с использованием стандартных методов. При проведении ПЦР и последующем секвенировании применялись следующие олигонуклеотиды (рис. 1):

— E2F, 5'-CTGGGCACAGAGAGGGGATTACG-3';
— E4R, 5'-GGGCAGCCGGGAGGACCATGATG-3';
— E5F, 5'-TGGGTCTCAGTGGGAGGAGAAG-3';
— E6R, 5'-TCTGGCCACAGCAGGGCTACCT-3';
— E7F, 5'-GGCAGCAATGCCCATGTCTTTG-3';
— E7R, 5'-GGGGCTCCTCGGTGGGCATCAG-3'.

Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Genetic Analyzer Model 3130 («Applied Biosystems», США). В качестве референсной последовательности гена *NR5A1* использовалась ссылка Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) под номером NM_004959. Обозначение мутаций проводили в соответствии с рекомендациями den Dunnen и Antonarakis [9].

При молекулярном анализе гена *NR5A1* у пробанда была обнаружена гетерозиготная мутация в

Сведения об авторах:

Калинченко Наталья Юрьевна — к.м.н., н.с. института клинической эндокринологии ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия, e-mail: kalinnat@rambler.ru;

Аносова Татьяна Александровна — к.м.н., детский эндокринолог ГБУЗ «ДГП №125» ДЗМ, Москва, Россия;

Иоутси Виталий Алексеевич — к.м.н., ст.н.с. ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия;

Тюльпаков Анатолий Николаевич — д.м.н., зав. отд. наследственных эндокринопатий института ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва, Россия

Таблица 1. Данные мультистероидного анализа (стероидный профиль до и после пробы с чХГ)

Определяемый стероид	Базальный уровень	Проба с чХГ	Норма, нмоль/л
ДГЭА	27,5	21,48	15–65
11-Дезоксикортизол	5,9	3,36	3,5–16
21-Дезоксикортизол	7,06	2,85	0,81–1,24
17-ОН прегненалон	7,15	5,66	0–10,5
17-ОН прогестерон	1,58	4,5	1,5–7,2
Андростендион	5,12	4,54	1,4–7,9
Кортизол	418,6	278,04	150–650
Кортикостерон	58,37	5,71	3,8–66,5
Прогестерон	0,1	0,41	0,8–3,9
Тестостерон	11,8	20,8	12–32

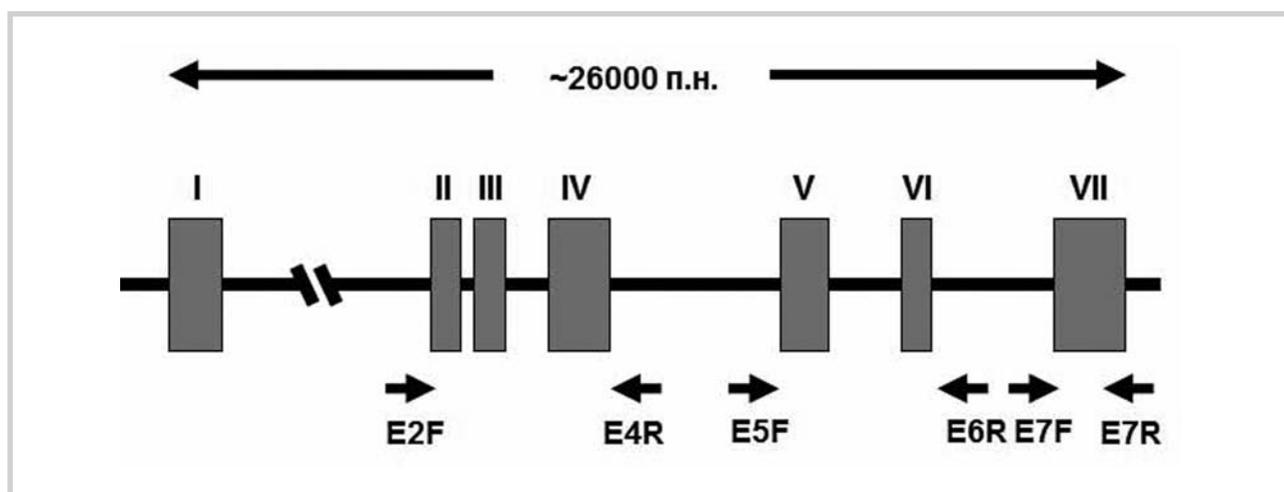


Рис. 1. Структура гена *NR5A1* с указанием мест отжига праймеров (схема).

Экзоны пронумерованы римскими цифрами.

экзоне 5 — делеция одного цитозинового основания в позиции 951, что приводило к сдвигу рамки считывания с заменой кодона гистидина (CAC) в положении 317 на кодон глутамина (CAG) и преждевременным образованием стоп-кодона (с.951delC р. Н317Q/sX17) (рис. 2).

Аналогичная мутация была выявлена у сибса, страдающего таким же заболеванием, а также у матери.

Обсуждение

Первые упоминания об «универсальном» факторе, регулирующем различные этапы стероидогенеза, появились в литературе в начале 90-х годов, когда был впервые клонирован ген, кодирующий стероидогенный фактор SF1 у мышей [4, 11].

SF1 принадлежит к большому семейству ядерных рецепторов, которые представляют собой ДНК-связывающие транскрипционные факторы. Он представляет собой белок, состоящий из 461 аминокислоты, который имеет ДНК-связывающий домен (DBD), лиганд-связывающий домен (LBD) и два ак-

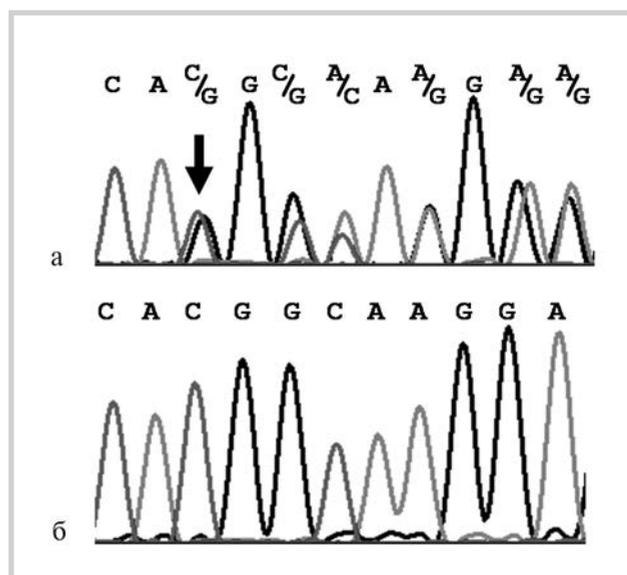


Рис. 2. Последовательности изученных фрагментов.

а — фрагмент последовательности экзона 5 гена *NR5A1* у пробанда — гетерозиготная делеция основания C в позиции 951 (отмечено стрелкой); аналогичные мутации выявлены у сибса и матери пациента; б — соответствующая фрагменту на рис. 2, а последовательность дикого типа (норма).

тивирующих домена — AF-1 (активатор функции 1) и AF-2 (активатор функции 2) [12].

Исходя из данных, полученных на трансгенных мышах, поиск мутаций в гене *NR5A1* начался с пациентов, имеющих классическую триаду фенотипических признаков: первичную надпочечниковую недостаточность, НФП 46XY и персистирующие производные мюллеровых протоков. Именно у пациента с таким фенотипом J. Achemann с соавт. [1] в 1999 г. выявили первый дефект в гене *NR5A1* — гетерозиготную мутацию G35E [1]. Однако, как показали последующие исследования, «классическая» триада при мутациях в гене *NR5A1* встречается очень редко. Кроме упомянутого случая, она описана лишь у 2 пациентов [13, 14]. Все остальные выявленные на сегодняшний день дефекты в гене *NR5A1* представляли собой гетерозиготные мутации и ассоциировались с НФП 46XY без надпочечниковой недостаточности [2, 5, 7, 15].

Большинство гетерозиготных мутаций в ДНК-связывающем домене SF1 клинически характеризуются почти полным женским строением наружных гениталий при наличии или отсутствии производных мюллеровых протоков. У таких пациентов отмечалась клиторомегалия, первичная аменорея, отсутствие роста молочных желез в пубертате. При гормональном исследовании у них находили снижение уровня АМГ, нарушение синтеза андрогенов на фоне нормального уровня надпочечниковых стероидов, низкий уровень базального и чХГ-стимулированного уровней тестостерона. Гистологический анализ удаленных гонад обычно выявлял их малые размеры с нормально развитой или частично недоразвитой тестикулярной тканью и немногочисленными герминативными клетками. Даже при отсутствии производных мюллеровых протоков в некоторых случаях гистологически определялись их остатки, расположенные вблизи яичка [7, 15].

В отличие от пациентов с мутациями в ДНК-связывающем домене, впервые описанный в 2007 г. ребенок с гетерозиготной мутацией *de novo* (L437Q), затрагивающей лиганд-связывающий домен SF1, имел при рождении мужской фенотип и признаки недостаточной вирилизации наружных гениталий: членомошоночную форму гипоспадии, микропенис с сохранной кавернозной тканью, искривление полового члена, двусторонний паховый крипторхизм. По данным эндокринологического обследования, проведенного на первом году жизни, имело место снижение синтеза андрогенов яичками при нормальной функции надпочечников. Минимальные проявления спонтанного пубертата и результаты обследования в возрасте 13 лет указывали на наличие парциального гипогонадотропного гипогонадизма в сочетании с первичным дефектом биосинтеза тестостерона яичками [15]. Основываясь на этих данных, L. Lin и соавт. [15] предположили, что в отличие от

мутаций в ДНК-связывающем домене гетерозиготные мутации в лиганд-связывающем домене SF1 проявляются более «мягким» фенотипом и могут быть причиной гипоспадии (особенно тяжелых форм) без явных признаков тяжелого тестикулярного дисгенеза и надпочечниковой недостаточности. Однако последующие наблюдения показали, что аналогичный фенотип может ассоциироваться также с мутациями в ДНК-связывающем домене, что свидетельствует об отсутствии корреляции между фенотипом и генотипом [6].

Причина развития заболевания при гетерозиготной мутации, вероятнее всего, обусловлена доминантно-негативным эффектом вследствие взаимодействия нормальных и мутантных молекул с образованием функционально неполноценных гетеромеров. В отношении SF1 это было продемонстрировано R. Cogea и соавт. [16] для одной из гетерозиготных мутаций. Аналогичный патогенетический механизм возможен и для выявленной нами гетерозиготной мутации с.951delC p.H317Q/X17. Результатом такой мутации является преждевременное образование стоп-кодона и укорочение молекулы SF1 до 333 аминокислотных остатков с потерей значительной части лиганд-связывающего домена белка. Укороченный SF1 образует гетеродимеры с нормальным белком, транслируемым с неизменного аллеля, приводя к нарушению функции всего гетеродимера. Другим вероятным механизмом является нонсенс-опосредованный распад мутантной мРНК и, как результат, синтез SF1 только с одного аллеля гена *NR5A1*. В обоих случаях можно ожидать минимум 50% снижения активности SF1, что, по-видимому, является критичным для синтеза тестостерона в яичках, но не влияет на стероидогенез в надпочечниках.

Аналогичная мутация была обнаружена у сибса, имеющего те же проявления заболевания в раннем возрасте, и у фенотипически здоровой матери. До недавнего времени считалось, что дефекты гена *NR5A1* не приводят к нарушению функции яичников, о чем свидетельствовало выявление гетерозиготных мутаций у матерей пациентов с НФП 46XY [6]. Однако недавно показано, что в ряде случаев гомо- и гетерозиготные мутации в гене *NR5A1* у женщин могут быть причиной первичной овариальной дисфункции и аномалий развития яичников без явлений надпочечниковой недостаточности, что связывают с неполной пенетрантностью мутантного аллеля гена, дефектами трансляции и влиянием факторов окружающей среды [9].

Заключение

Описанный клинический случай демонстрирует важность проведения молекулярно-генетического обследования детей с тяжелыми формами гипоспадии и детей, у которых имеется сочетание гипоспа-

дии с крипторхизмом. Учитывая наличие дисгенезии гонад и риск их злокачественного перерождения, при верификации дефекта SF1 пациентам показано длительное наблюдение эндокринолога и андролога. Вопрос о риске развития у таких пациентов надпочечниковой недостаточности остается открытым.

Конфликт интересов отсутствует.

Комплекс лабораторно-инструментальных и молекулярно-генетических исследований проведен при поддержке ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Achermann JC, Ito M, Ito M, et al. A Mutation In The Gene Encoding Steroidogenic Factor-1 Causes Xy Sex Reversal And Adrenal Failure In Humans. *Nat Genet.* 1999;22(2):125-126. doi: 10.1038/9629.
2. Kohler B, Lin L, Mazon I, et al. The Spectrum Of Phenotypes Associated With Mutations In Steroidogenic Factor 1 (SF-1, Nr5a1, Ad4bp) Includes Severe Penoscrotal Hypospadias In 46,Xy Males Without Adrenal Insufficiency. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(2):237-242. doi: 10.1530/Eje-09-0067.
3. Thomson SA, Baldwin WS, Wang YH, et al. Annotation, phylogenetics, and expression of the nuclear receptors in *Daphnia pulex*. *BMC Genomics.* 2009;10:500. doi: 10.1186/1471-2164-10-500.
4. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(24):10939-10943. PMC40546.
5. Hasegawa T, Fukami M, Sato N, et al. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):5930-5935. doi: 10.1210/jc.2004-0935.
6. Kohler B, Lin L, Ferraz-de-Souza B, et al. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46,XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency. *Hum Mutat.* 2008;29(1):59-64. doi: 10.1002/humu.20588.
7. Lin L, Achermann JC. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development. *Sex Dev.* 2008;2(4-5):200-209. doi: 10.1159/000152036.
8. Rubtsov P, Nizhnik A, Dedov I, et al. Partial deficiency of 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase caused by a novel missense mutation in the canonical cytochrome heme-interacting motif. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(5):K19-25. doi: 10.1530/EJE-14-0834.
9. Dunnen JTD, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. *Hum Mutat.* 2000;15(1):7-12. doi: 10.1002/(sici)1098-1004(200001)15:1<7::aid-humu4>3.0.co;2-n.
10. Lourenco D, Brauner R, Lin L, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med.* 2009;360(12):1200-1210. doi: 10.1056/NEJMoa0806228.
11. Oba K, Yanase T, Nomura M, et al. Structural Characterization of Human Ad4bp (SF-1) Gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(1):261-267. doi: 10.1006/bbrc.1996.1343.
12. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, et al. Phosphorylation of the Nuclear Receptor SF-1 Modulates Cofactor Recruitment. *Mol Cell.* 1999;3(4):521-526. doi: 10.1016/s1097-2765(00)80480-3.
13. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, et al. Gonadal Determination and Adrenal Development Are Regulated by the Orphan Nuclear Receptor Steroidogenic Factor-1, in a Dose-Dependent Manner. *J Clin Endocr Metab.* 2002;87(4):1829-1833. doi: 10.1210/jcem.87.4.8376.
14. Biason-Lauber A, Schoenle EJ. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet.* 2000;67(6):1563-1568. doi: 10.1086/316893.
15. Lin L, Philibert P, Ferraz-de-Souza B, et al. Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46,XY disorders of sex development with normal adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(3):991-999. doi: 10.1210/jc.2006-1672.
16. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1767-1772. doi: 10.1210/jc.2003-031240.