

Polimorfizm genu CYP17 a wiek *menarche*

Polymorphism of CYP17 gene and age of *menarche*

Kulik-Rechberger Beata¹, Skorupski Paweł², Bogusiewicz Michał², Miotła Paweł²,
Rechberger Tomasz²

¹ Zakład Propedeutyki Pediatrii Akademii Medycznej im prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie

² II Katedra i Klinika Ginekologii Akademii Medycznej im prof. F. Skubiszewskiego w Lublinie

Streszczenie

Cel pracy: Uważa się, że wiek *menarche* może zależeć od polimorfizmu genów warunkujących syntezę estrogenów. Do takich należy gen CYP17 kodujący białko enzymatyczne cytochromu P450c17 α , od którego uzależniona jest aktywność dwu kluczowych enzymów szlaku syntezy hormonów steroidowych: 17 α -hydroksylazy i 17,20-liazy. Polimorfizm dotyczący zamiany nukleotydu cytozynowego na tymidynowy w regionie 5' genu CYP17 skutkuje wytworzeniem dodatkowego miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny Sp-1, co z kolei może zwiększać syntezę estrogenów i androgenów. Celem niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a wiekiem wystąpienia *menarche*.

Materiał i metodyka: Grupę badaną stanowiły 124 zdrowe dziewczęta z regionu lubelskiego. Dziewczęta obserwowano od okresu przedpokwitaniowego, co pozwoliło na dokładne ustalenie daty pierwszej miesiączki.

Oznaczenie zmienności polimorficznej genu CYP17 przeprowadzono przy pomocy RFLP-PCR z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego Msp AI. Allel posiadający miejsce restrykcyjne oznaczono jako A2, allel oporny na trawienie jako A1.

Wyniki: Otrzymano następujący rozkład genotypów: A1/A1 – 36 (29,0%), A1/A2 – 67 (54,0%) oraz A2/A2 – 21 (17%). Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy nosicielkami poszczególnych genotypów i wynosił: dla A1/A1 – 13,14 $\pm$ 0,92 lat, dla A1/A2 – 12,93 $\pm$ 1,04 lat oraz dla A2/A2 – 13,40 $\pm$ 0,91 lat, przy czym późniejszy wiek *menarche* u nosicielek genotypu A2/A2 w porównaniu do nosicielek genotypu A1/A2 był bliski istotności statystycznej ($p=0,058$).

Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupami dziewcząt, u których pierwsza miesiączka wystąpiła przed i po trzynastym roku życia.

Wniosek: Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki nie wykazuje zależności od zmienności polimorficznej genu CYP17.

Słowa kluczowe: **polimorfizm genu CYP17 / *menarche***

Adres do korespondencji:

Beata Kulik-Rechberger
Zakład Propedeutyki Pediatrii AM w Lublinie
20-093 Lublin, ul Chodźki 2
e-mail: brechberger@interia.pl

Otrzymano: 05.10.2007

Zaakceptowano do druku: 17.11.2007

Abstract

Objectives: It is believed that the age of menarche may be related to polymorphisms in the genes involved in estrogen biosynthesis. A candidate gene is CYP 17 encoding cytochrome P450 c17 α , which mediates activity of steroid 17-hydroxylase and 17,20-lyase. A single base-pair change (T→C) in the promoter region of CYP 17 creates a polymorphic variant with an additional SP-1 transcription factor binding site. The aim of our study was to evaluate the relationship between CYP 17 gene polymorphism and the age of menarche.

Materials and methods: The study group was composed of 124 healthy Caucasian girls inhabiting the Lublin region (Poland). The observation had began from prepubertal period, thus allowing for the age of menarche to be recorded precisely. CYP 17 polymorphism was assessed with RLFP-PCR using Msp AI restriction endonuclease. An allele with the respective restriction site was designated as A2, whereas one resistant to restriction enzyme as A1.

Results: The following frequency of CYP17 genotypes has been observed: A1/A1- 36 (29.0%), A1/A2- 67 (54.0%) and A2/A2- 21 (17.0%). The mean age of menarche for these three genotypes did not differ significantly and was: A1/A1- 13.14±0.92, A1/A2- 12.93±1.04 and A2/A2- 13.40±0.91 years, although later age of first menstrual period in carriers of A2/A2 genotype compared with carriers of A1/A2 was nearly statistically significant ($p=0.058$). The distribution of CYP17 genotypes in groups of girls with onset of menarche before and after thirteenth year of age did not differ significantly.

Conclusion: The age of menarche in population of Polish girls is not associated with the polymorphism of CYP 17 gene.

Key words: **CYP17 gene polymorphism / menarche /**

Wstęp

Wiek pierwszej miesiączki (*menarche*) jest ważnym modulatorem ryzyka wystąpienia niektórych schorzeń, jak również znacząco wpływa na procesy reprodukcyjne w dalszych latach życia. Istnieją doniesienia, iż wczesna *menarche* stanowi czynnik ryzyka zachorowania na raka sutka oraz raka *endometrium* [1, 2], podczas gdy późna *menarche* zwiększa ryzyko choroby Alzheimera i osteoporozy, a zmniejsza ryzyko choroby niedokrwiennej serca [2].

Jednym z zasadniczych czynników wpływających na wiek wystąpienia pierwszej miesiączki są uwarunkowania genetyczne. Świadczy o tym fakt zależności pomiędzy *menarche* u matek i córek oraz siostr, a także u bliźniąt jednojajowych [3, 4].

Dotychczas nie ustalono jednakże, od których genów zależy wiek jej wystąpienia. Zważywszy, że podlega on regulacji hormonalnej [5, 6], można przypuszczać, że istotne znaczenie ma zmienność polimorficzna genów kodujących białka uczestniczące w szlaku syntezy hormonów płciowych. Jednym z tych genów jest CYP17 zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10. Zawiera on 8 egzonów i koduje białko enzymatyczne cytochromu P450c17 α [7]. Od tego cytochromu uzależniona jest aktywność dwu kluczowych enzymów szlaku syntezy hormonów steroidowych: 17 α -hydroksylazy i 17,20-liazy. W niepodlegającym translacji regionie 5' genu stwierdzono obecność polimorfizmu dotyczącego zamiany nukleotydu cytozynowego na tymidynowy, co powoduje powstanie allelu określanego jako A2, podatnego na trawienie enzymem restrykcyjnym Msp AI [6]. Polimorfizm ten powoduje wytworzenie dodatkowego miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny Sp-1 (CCACC box) w regionie promotorowym genu. Uważa się, że może to prowadzić do zwiększenia aktywności promotorowej i nasilenia transkrypcji genu CYP17, co z kolei wpływa na większą syntezę estrogenów i androgenów [3].

Powyższa hipoteza ma swoich przeciwników, którzy wykazali, że dodatkowe miejsce wiązania SP-1 nie jest wykorzystywane podczas transkrypcji [8, 9].

Pomimo niejednoznacznego związku pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a poziomem ekspresji cytochromu P450c17 α , u nosicieli allelu A2 obserwowano wyższe stężenia estrogenów [10, 11, 12, 13].

Ponadto obecność allelu A2 kojarzyła się z wyższymi stężeniami niektórych androgenów: androstendionu i siarczanu dehydroepiandrosteronu [12, 13].

Cel pracy

Celem niniejszej pracy była ocena zależności pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a wiekiem wystąpienia pierwszej miesiączki u dziewcząt zamieszkujących region lubelski.

Materiały i metody

Badaniem objęto 124 zdrowe dziewczęta z losowo wybranych klas trzecich szkół podstawowych w Parczewie i Lubartowie (małe miasta położone na wschód od Lublina). W momencie rozpoczęcia obserwacji najmłodsza dziewczynka miała 9,2 lata, najstarsza 10,7 lat (średnia wieku 9,79±0,29 lat). W odstępach sześciomiesięcznych zbierano wywiad odnośnie stanu zdrowia dziewcząt i daty pierwszej miesiączki, którą rodzice i dziewczęta odnotowywały w kalendarzyku. Jednorazowo, do próbek z EDTA pobierano krew, którą przechowywano w temp. -20°C do czasu wykonania badań genetycznych. Genomowe DNA wyizolowano z leukocytów krwi obwodowej stosując Flexi Gene DNA kit (Quiagen, Hilden, Germany). Fragment DNA długości 459 pz zawierający miejsce polimorficzne namnażano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy, wykorzystując startery: 5'CAT TCG CAC TCT GGA GTC 3' oraz 5' AGG CTC TTG GGG TAC TTG 3'. Amplifikację DNA przeprowadzano w 35 cyklach, w następujących warunkach: denaturacja w temp. 94°C przez 60s., przyłączanie starterów w temp. 57°C przez 60s., wydłużanie starterów w temp. 72°C przez 60s. Produkty PCR zostały poddane trawieniu enzymem restrykcyjnym Msp A, a następnie rozdzielane na 2% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny.

W przypadku allelu A1, opornego na działanie enzymu restrykcyjnego uzyskano fragment DNA długości 459 pz. Obecność miejsca restrykcyjnego charakteryzująca allel A2 powodowała powstawanie fragmentów o długości 335 pz i 124 pz.

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica Statsoft wersja 6.0. Zgodność dystrybucji genotypów z równaniem Hardy-Weinberga oraz analizę różnic rozkładu genotypów pomiędzy badanymi grupami przeprowadzono przy pomocy testu χ^2 . Zależności pomiędzy genotypami a wiekiem *menarche* oceniono testem Anova. Jako istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Lublinie. Rodzice dziewcząt podpisali świadomą zgodę na ich udział w badaniu.

Wyniki

Średnia wieku dziewcząt w czasie ostatniego badania wynosiła $15,3 \pm 0,33$ lat (zakres: od 13,96 lat do 16,3 lat). Wszystkie dziewczęta były po *menarche*. Średnia wieku pierwszej miesiączki dla grupy wynosiła $13,05 \pm 0,97$ lat. Spośród badanych tylko jedna dziewczynka miała *menarche* poniżej dziesiątego roku życia, w wieku 9,62 lat. (Tabela I).

Tabela I. *Menarche* w zależności od wieku dziewcząt.

	Grupy wiekowe					
	9-9,99 (lata)	10-10,99 (lata)	11-11,99 (lata)	12-12,99 (lata)	13-13,99 (lata)	14 i powyżej (lata)
Liczność (odsetek)	1 (0,8%)	0 (0%)	14 (11,1%)	47 (37,3%)	44 (34,9%)	18 (15,9%)

U 18 (15,9%) dziewcząt pierwsza miesiączka wystąpiła po czternastym, w tym u 4 (3,2%) po piętnastym roku życia. Najstarsza z nich w czasie *menarche* miała 15,56 lat. Liczność i odsetek dziewcząt po *menarche* w poszczególnych grupach wiekowych podano w tabeli I.

Rozkład genotypów polimorfizmu CYP17 przedstawiał się następująco: A1/A1 – 36 (29,0%), A1/A2 – 67 (54,0%) oraz A2/A2 – 21 (17%), był zgodny z równaniem Hardego-Weinberga i mieścił się w zakresie wartości charakterystycznych dla populacji europejskich [14].

Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy nosicielkami poszczególnych genotypów i wynosił: dla A1/A1 $13,14 \pm 0,92$ lat, dla A1/A2 $12,93 \pm 1,04$ lat oraz dla A2/A2 – $13,4 \pm 0,91$ lat, przy czym należy zaznaczyć, że dziewczęta z genotypem A2/A2 miały *menarche* niemal istotnie statystycznie ($p < 0,058$) później niż nosicielki genotypu A1/A2. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w rozkładzie genotypów pomiędzy grupami dziewcząt, u których pierwsza miesiączka wystąpiła przed i po trzynastym roku życia. (Tabela II).

Dyskusja

Długofalowe badania dotyczące okresu dojrzewania dziewcząt lubelskich prowadzone w latach osiemdziesiątych

Tabela II. Rozkład genotypów polimorfizmu genu CYP 17 w zależności od wieku wystąpienia *menarche*. Różnice nie są istotne statystycznie ($\chi^2 = 0,677$; $p = 0,72$).

Wiek <i>menarche</i>	Genotyp A1/A1	Genotyp A1/A2	Genotyp A2/A2
< 13 roku życia	17 (27,4%)	37 (59,7%)	8 (12,9%)
> 13 roku życia	19 (30,6%)	30 (48,4%)	13 (21,0%)
Razem	36 (29,0 %)	67 (54,0%)	21 (17,0%)

wykazały, że dziewczęta zaczynają miesiączkować średnio w 12,98 roku życia [15]. Obecnie średnia wieku *menarche* jest podobna, co świadczy o zahamowaniu akceleracji rozwoju płciowego, notowanej w ubiegłych stuleciach. Zmniejszenie się dysproporcji pomiędzy warunkami, w jakich rozwijają się dzieci sprawia, że różnice w wieku wystąpienia pierwszej miesiączki w większej mierze mogą wynikać z uwarunkowań genetycznych. Jednym z genów odpowiedzialnych za to zdarzenie może być gen CYP17 kodujący białko enzymatyczne cytochromu P450c17 α , od którego uzależniona jest aktywność enzymów szlaku syntezy hormonów steroidowych. Dotychczas opublikowane badania oceniające zależność pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a wiekiem *menarche* miały charakter retrospektywny. Dane o pojawieniu się pierwszej miesiączki pochodziły z wywiadu w związku z czym uzyskiwano informacje o wydarzeniu, które miało miejsce kilkanaście lub kilkadziesiąt lat wcześniej. Objęcie obserwacją dziewcząt w okresie przedpokwitaniowym pozwoliło nam na bardzo dokładne odnotowanie daty *menarche*.

Uzyskane przez nas wyniki nie wskazują, aby w badanej populacji dziewcząt zamieszkujących region lubelski istniał wyraźny związek pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a pojawieniem się pierwszej miesiączki.

Wyniki uzyskane przez innych autorów zajmujących się tym zagadnieniem nie są jednoznaczne. Badając populację kobiet amerykańskich, Feigelson i wsp. [16] obserwowali nieznacznie, ale istotnie statystycznie, późniejszy wiek pierwszej miesiączki u osób z genotypem A1/A1 w porównaniu do nosicielek allelu A2 (13,4 lat wobec 13,0 lat). Autorzy ci odnotowali również, że u osób z genotypem A1/A1, w porównaniu do nosicielek allelu A2, pierwsza miesiączka częściej pojawiała się po 13 roku życia (odpowiednio 38,3% wobec 28,5%), przy czym zależność ta nie była znamienista statystycznie.

Odmienne wyniki uzyskali Helzlsouer i wsp. [17], którzy również badali populację kobiet amerykańskich. Stwierdzili oni, że u nosicielek allelu A2 *menarche* występowała później w porównaniu do homozygot A1 (odpowiednio 60% wobec 42% *menarche* w wieku 13 lat lub więcej), lecz zależność nie była istotna statystycznie. Podobne tendencje obserwowano również w badaniach własnych. Homozygoty A2 miały niemal statystycznie istotnie później *menarche* niż nosicielki genotypu A1/A2, ale nie później niż homozygoty A1.

Z kolei Gorai i wsp. [18] stwierdzili niższy wiek *menarche* u dziewcząt japońskich z genotypem A1/A2 ($13,6 \pm 1,2$ lat) w porównaniu do genotypu A1/A1 ($14,1 \pm 1,3$ lat), ale brak było istotnych statystycznie różnic w porównaniu do genotypu A2/A2.

Chociaż wyniki wielu innych badań [11, 14, 19, 20] nie potwierdziły zależności pomiędzy polimorfizmem genu CYP17 a wiekiem *menarche*, nie można wykluczyć, że jej wystąpienie warunkują geny kodujące białka uczestniczące w metabolizmie hormonów płciowych. Możliwość taką sugerują wyniki uzyskane przez Guo i wsp. [20], którzy w populacji kobiet rasy białej stwierdzili, że wystąpienie pierwszej miesiączki wiąże się ze zmiennością polimorficzną genu CYP19 kodującego białko aromatazy, przy jednoczesnym braku związku z polimorfizmem genu CYP17.

Zważywszy na fakt, że na chromosomie 15, w pobliżu genu CYP19, zlokalizowane są inne geny kodujące białka szlaku syntezy hormonów płciowych (CYP11 i CYP11A1), a ich dziedziczenie jest ze sobą powiązane [21], prawdopodobne jest, że wiek wystąpienia pierwszej miesiączki może zależeć od zmienności polimorficznej tych genów.

Wnioski

1. Rozkład genotypów polimorfizmu genu CYP17 w populacji dziewcząt zamieszkujących region lubelski jest zgodny z równaniem Hardego-Weinberga i podobny do obserwowanego w innych populacjach europejskich.
2. Wiek wystąpienia pierwszej miesiączki nie wykazuje zależności od zmienności polimorficznej genu CYP17.

Praca finansowana ze środków KBN, projekt badawczy nr 2 P05E 045 27

Piśmiennictwo

1. Apter D, Vihko R. Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983, 57, 82-86.
2. Rees M. The age of menarche. *ORGIN.* 1995, 4, 2-4.
3. Kaprio J, Rimpela A, Winter T, [et al]. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Hum Biol.* 1995, 67, 739-753.
4. van den Akker O, Stein G, Neale M, [et al]. Genetic and environmental variation in menstrual cycle: histories of two British twin samples. *Acta Genet Med Gemellol.* 1987, 36, 541-548.
5. MacMahon B, Trichopoulos D, Brown J, [et al]. Age at menarche, urine estrogens and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 1982, 30, 427-431.
6. Apter D, Vihko R. Premenarcheal endocrine changes in relation to age at menarche. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1985, 22, 753-760.
7. Carey A, Waterworth D, Patel K, [et al]. Polycystic ovaries and premature male pattern baldness are associated with one allele of the steroid metabolism gene CYP17. *Hum Mol Genet.* 1994, 3, 1873-1876.
8. Nedelcheva Kristensen V, Haraldsen E, Anderson K, [et al]. CYP17 and breast cancer risk: the polymorphism in the 5' flanking area of the gene does not influence binding to Sp-1. *Cancer Res.* 1999, 59, 2825-2828.
9. Lin C, Martens J, Miller W. NF-1C, Sp1, and Sp3 are essential for transcription of the human gene for P450c17 (steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) in human adrenal NC1-H295A cells. *Mol Endocrinol.* 2001, 15, 1277-1293.
10. Feigelson H, Shames L, Pike M, [et al]. Cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res.* 1998, 58, 585-587.
11. Haiman C, Hankinson S, Spiegelman D, [et al]. The relationship between a polymorphism in CYP17 with plasma hormone levels and breast cancer. *Cancer Res.* 1999, 59, 1015-1020.
12. Daneshmand S, Weitsman S, Navab A, [et al]. Overexpression of theca-cell messenger RNA in polycystic ovary syndrome does not correlate with polymorphisms in the cholesterol side-chain cleavage and 17alpha-hydroxylase/C17-20-lyase promoters. *Fertil Steril.* 2002, 77, 274-280.
13. Small C, Marcus M, Sherman S, [et al]. CYP17 genotype predicts serum hormone levels among pre-menopausal women. *Hum Reprod.* 2005, 20, 2162-2167.
14. Sharp L, Cardy A, Cotton S, [et al]. CYP17 gene polymorphisms: prevalence and associations with hormone levels and related factors. A HuGE Review. *Am J Epidemiol.* 2004, 160, 729-740.
15. Chrzastek-Spruch H, Hausie R, Kozłowska M, [et al]. Okres dojrzewania u dziewcząt i chłopców lubelskich – badania długofalowe. *Pediatr Pol.* 1992, 9 [Suppl], 104-107.
16. Feigelson H, Coetzee G, Kolonel L, [et al]. A polymorphism in the CYP17 gene increases the risk of breast cancer. *Cancer Res.* 1997, 57, 1063-1065.
17. Helzlsouer K, Huang H, Strickland P, [et al]. Association between CYP17 polymorphisms and the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998, 7, 945-949.
18. Gorai I, Tanaka K, Inada M, [et al]. Estrogen-metabolizing gene polymorphisms, but not estrogen receptor-alpha gene polymorphisms, are associated with the onset of menarche in healthy postmenopausal Japanese women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88, 799-803.
19. Lai J, Vesprini D, Chu W, [et al]. CYP gene polymorphisms and early menarche. *Mol Genet Metab.* 2001, 74, 449-457.
20. Guo Y, Xiong D, Yang T, [et al]. Polymorphisms of estrogen-biosynthesis genes CYP17 and CYP19 may influence age at menarche: a genetic association study in Caucasian females. *Hum Mol Genet.* 2006, 15, 2401-2408.
21. Kristensen V, Tsalenko A, Geisler J, [et al]. Multilocus analysis of SNP and metabolic data within a given pathway. *BMC Genomics.* 2006, 7, 5.