



УДК 577.152.1:575.174.015.3:681.3

М. Ю. Сиволап, В. Й. Кресюн, Г. І. Сліщук

## ФАРМАКОГЕНЕТИЧНІ ПЕРСПЕКТИВИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЦИТОХРОМУ СYP3A4 З ВИКОРИСТАННЯМ БІОІНФОРМАЦІЙНИХ ПІДХОДІВ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 577.152.1:575.174.015.3:681.3

М. Ю. Сиволап, В. И. Кресюн, Г. И. Сливчук

### ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ЦИТОХРОМА СYP3A4 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНФОРМАЦИОННЫХ ПОДХОДОВ

*Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина*

Для индивидуализации фармакотерапии важно учитывать особенности генотипа человека. СYP3A4 является важным для фармакологии, так как биотрансформирует около 50 % лекарственных средств, поэтому изучение гена *cyp3a4* представляет значительный интерес. Разработка технологии определения генного полиморфизма экспериментальным путем требует немалого объема времени и ресурсов. Довольно часто работы проводятся по подобранным ранее параметрам, что значительно суживает возможности исследований. С развитием биоинформатики указанный выше процесс может быть более эффективным. Исследован полиморфизм гена *cyp3a4 in silico* и подобраны параметры для дальнейшего изучения аллелей этого гена. Данные результаты позволяют более эффективно решать задачи, поставленные перед фармакогенетикой.

**Ключевые слова:** фармакогенетика, цитохром P450, СYP3A4, полиморфизм, биоинформационные моделирующие программы.

UDC 577.152.1:575.174.015.3:681.3

M. Yu. Sivolap, V. Y. Kresyun, G. I. Slishchuk

### THE PHARMACOGENETIC PROSPECTS OF CYP3A4 CYTOCHROME POLYMORPHISM INVESTIGATION WITH USING BIOINFORMATION APPROACHES

*The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine*

**Purpose:** it is defined that gene polymorphisms influence on pharmacokinetics and pharmacodynamics of the majority of preparations. CYP3A4 is important for pharmacology, as it transforms about 50% of medical means. Thus, gene studying *cyp3a4* represents considerable interest. Working out technology of definition of gene polymorphism experimentally occupies considerable volume of time and resources. Often enough works are conducted using the parameters obtained earlier that considerably narrows possibilities of researchers. With bioinformatic development the process specified above can be much more effective.

**Methods:** used nucleotide sequences of gene *cyp3a4 Homo sapiens*, found in gene bank NCBI by means of algorithm BLAST: nucleotide sequences levelled by means of Nidman-Wunsh's algorithm in the ClustalW program. Design of primers and *in silico* PCR, restriction analysis of amplicons and electrophores was conducted by means of Vector NTI 11 program.

**Results:** qualitative global alignment nucleotide sequences for the purpose of the gene analysis *cyp3a4* was conducted, the marker technique is developed for the polymorphism and differentiation analysis allels this gene.

**Conclusions:** by means of bioinformation modelling programs polymorphism of the gene *cyp3a4 in silico* is investigated and parameters for the further studying allels gene are picked up. The presented results will allow to solve more effectively the problems put before pharmacogenetic.

**Key words:** pharmacogenetic, cytochrome P450, CYP3A4, polymorphism, bioinformation modelling programs.



## Вступ

Підвищення ефективності ліків та індивідуалізація їх застосування залежать від ураховання особливостей генотипу людини. Визначено генні поліморфізми, які впливають на фармакокінетику й фармакодинаміку для низки лікарських препаратів, включаючи успадковані відмінності в мішенях (наприклад рецептори), метаболізуючі й транспортні функції організму. Виникнення полігенних детермінантів викликає численні комбінації метаболізму ксенобіотиків, зумовлює широкий спектр терапевтичних індексів (співвідношення ефективність/токсичність) для даного медикаменту [5].

Метаболічні процеси за участі ферментів, як правило, класифікуються як реакції I або II фази. Реакції I фази викликають структурні зміни введеної речовини лікарського засобу шляхом окиснення, відновлення або гідролізу для створення більш водостійких метаболітів. Ці реакції часто утворюють «місток» для подальших модифікацій реакцій наступної II фази або перетворення ксенобіотиків у неактивні метаболіти. Реакції I фази зумовлені, головним чином, суперсімейством ферментів, позначених терміном «Цитохром P450».

Реакції II фази характеризуються зв'язуванням водорозчинної ендогенної молекули з хімічною речовиною, утвореною в I фазі для полегшення екскреції. Суперсімейства ферментів, що каталізують реакції II фази, називають відповідно до ендогенних кон'югуючих половинок, наприклад: ацетилювання за участі N-ацетилтрансферази, сульфатування під впливом сульфотрансферази, кон'югація глутатіону під

впливом глутатіонтрансферази і глюкоронізація за участі Udr-глюкуронозилтрансферази [3].

Цитохром P450 є комплексом білка з ковалентно зв'язаним гемом (металопротеїном), що забезпечує приєднання кисню. Гем, у свою чергу, є комплексом протопорфірину IX і двовалентного атома заліза. Число 450 означає, що відновлений гем, зв'язаний з киснем, характеризується максимумом поглинання світла при довжині хвилі 450 нм.

Ізоформи цитохрому P450 об'єднані в сімейства CYP1, CYP2, CYP3. У сімействах виділені підсімейства A, B, C, D, E. У межах підсімейств ізоформи позначені порядковим номером. Наприклад, CYP2C19 — найменування 19-го за упорядкуванням цитохрому підсімейства «C», сімейства «2». Існує близько 250 різних видів цитохрому P450, з них приблизно 50 — в організмі людини, і тільки сім із них (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) мають відношення до метаболізму ліків [1].

Одним із найважливіших для фармакології є CYP3A4, тому що він біотрансформує близько 50 % лікарських препаратів [5]. Ген *сур3а4* становить значний інтерес і йому приділяється увага у вивченні деяких напрямів фармакогенетики, але одержані результати часто неоднозначні й суперечливі, що потребує подальших досліджень. Тому аналіз поліморфізму *сур3а4* у зіставленні з фармакокінетичними особливостями лікарських засобів є сучасним напрямом у розвитку персоналізованої медицини [4; 6–8].

Розробка технології визначення молекулярно-генетичного поліморфізму експери-

ментальним шляхом зазвичай потребує чималого часу й ресурсів. Цей процес складається з секвенування, дизайну праймерів, вибору рестриктаз, режимів реакцій, концентрації реагентів, умов полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) тощо. Досить часто роботи проводять за заздалегідь підібраними параметрами, що значно звужує можливості дослідження. З розвитком біоінформатики як науки увесь зазначений вище процес може бути ефективнішим. Зібрані в національних і міжнародних бібліотеках дані про нуклеотидні послідовності геномів і генів можна аналізувати за допомогою спеціальних комп'ютерних програм з наданням найбільш перспективних алгоритмів для подальшого дослідження поліморфізму гена, що зацікавив, у зіставленні з різними функціональними властивостями, наприклад, швидкістю метаболізму лікарських засобів [2].

**Мета** дослідження — за допомогою біоінформаційних і моделюючих програм дослідити поліморфізм гена *сур3а4 in silico* та підібрати параметри для визначення алелів, що корелюють з метаболічною активністю щодо ксенобіотиків.

## Матеріали та методи дослідження

Використовували 24 нуклеотидні послідовності гена *сур3а4 Homo sapiens*, знайдені в генбанку NCBI [9] за допомогою алгоритму BLAST: AF182273, AJ563375, AJ563376, AJ563377, AK223008, BC033862, HUMCYPEN, NM\_000777, AK313813, NM\_057095, BC067436, BC069780, HUMXYPFLA, NM\_000765, DQ924960, BC069352, X12387, HUMCYPNO, BC069418, AK312967, BC101631, AK298462, AK298451, NM\_017460. Нуклеотидні послідовності ви-



рівнювали за алгоритмом Нідлмана — Вунша [10] у програмі ClustalW. Дизайн праймерів та *in silico* ПЛР, рестрикційний аналіз ампліконів й електрофорез здійснювали за допомогою програми Vector NTI 11.

### Результати дослідження та їх обговорення

У результаті вирівнювання 24 нуклеотидних послідовностей побудовано філогенетичну дендрограму (рис. 1). На дендрограмі можна виділити 6 кластерів, які відрізнялися між собою, що може бути пов'язано з наявністю 6 відмітних алелів цього гена у популяції. Ген виявився відносно поліморфним: так, у середньому рівень гомології становив 75 %, рівень комплексності був високим, що дозволило провести якісне глобальне вирівнювання нуклеотидних послідовностей з метою аналізу поліморфізму гена *сур3а4* та створення маркерної системи для аналізу поліморфізму й диференціації алелів цього гена.

Найбільш варіабельною виявилася ділянка гена, близька до центральної частини. Характерними були однонуклеотидні заміни (SNP), а також інсерції/делеції (InDel), вставки були максимум 3 п. н.

До варіабельного регіону 1291–1406 п. н. була підібрана пара праймерів VSGI<sub>сур3а4</sub> (SP gatccttacatatacacacc, ASP ttgaaggagaagttctgaag), що продукувала в усіх сиквенсах продукт молекулярною масою 116 п. н.

Продукти ПЛР були також вирівняні за допомогою алгоритму Нідлмана — Вунша в програмі ClustalW з метою виявлення поліморфізму ампліконів. Загальна будова дендрограми відповідала такій, що була побудована за результатами вирівнювання пов-

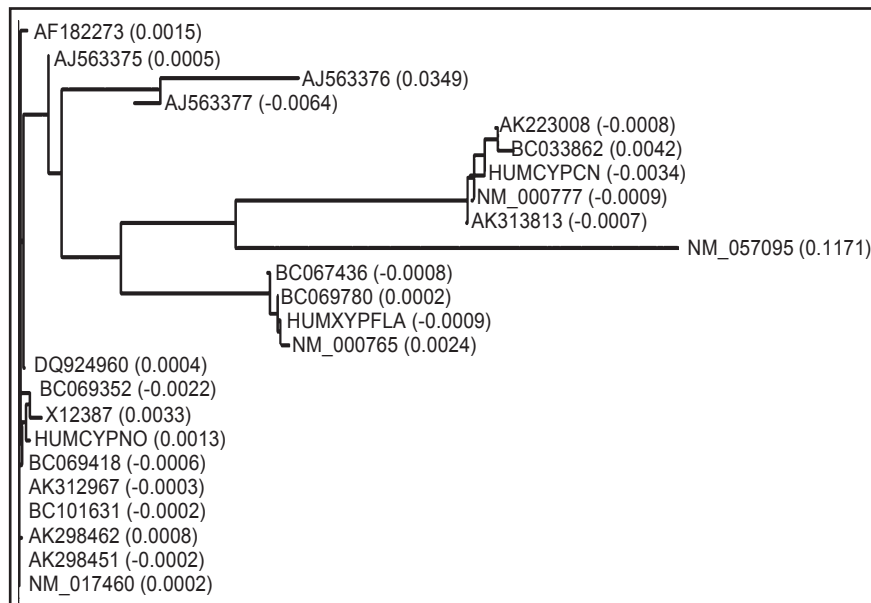


Рис. 1. Філогенетична дендрограма взаємовідношень алелів гена *сур3а4*

них сиквенсів, що свідчить про вдалий вибір сайтів праймування. Поліморфізм ампліконів, у цілому, відповідає поліморфізму повних послідовностей, тому що за результатами вирівнювання як цілих послідовностей, так і ампліконів було можливим відрізнити 6 кластерів (див. рис. 1, рис. 2). Проведений ПЛР-аналіз із використанням розробленого дизайну праймерів дозволяє ви-

являти майже весь спектр поліморфізму гена *сур3а4*.

Для розкриття потенціалу поліморфізму розробленого дизайну ПЛР-праймерів проведено рестрикційний аналіз ампліконів *in silico*. Рестриктазами, що давали поліморфні (тобто ті, які були відмітними у різних алелів) ділянки виявилися AclII, AluI, AlwN1, BfaI, BsiHKA, Bsp1286I, BspH1, BsrI, BssS1, CviAII, CviJ1, FatI,

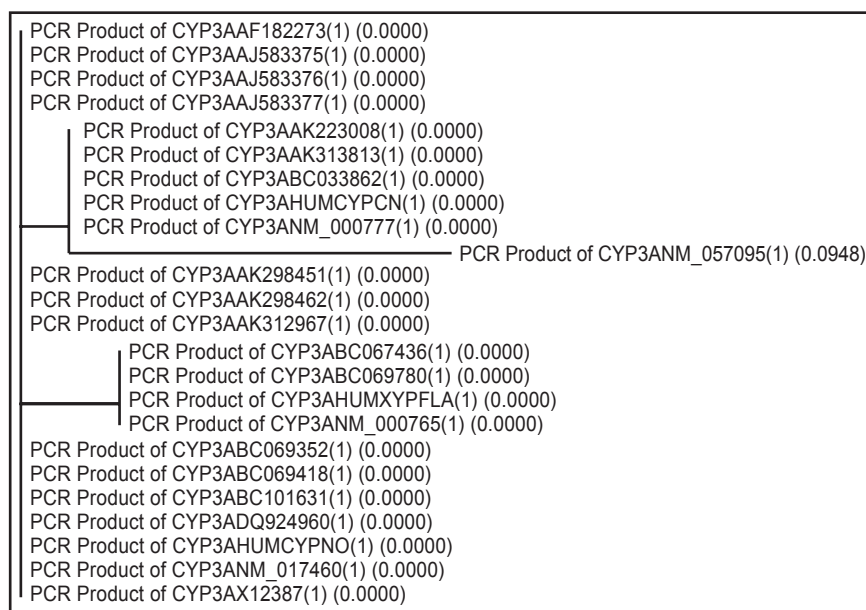


Рис. 2. Філогенетична дендрограма, побудована за результатами вирівнювання ампліконів

HinFI, Hpy188I, Hpy188III, HpyAV, HpyCH4I, MlyI, MslI, NlaIII, PleI, Sth132I, TspDTI, Tth111I.

Рестриктази AceIII, AluI, AlwN1, BsiHKA, Bsp1286I, CviJ1, HinFI, Hpy188I, Hpy188III, HpyAV, MlyI, PleI, Sth132I та Tth111I дозволили диференціювати тільки NM\_057095 від інших алелів (рис. 3, а), сайт рестрикції лише у зразка 23, що помітно за різницею кількості та розмірів бендів, тимчасом як рестриктази BfaI, BspH1, BsrI, BssS1, CviAII, FatI, HpyCH4I, MslI, NlaIII та TspDTI дозволяли вивчати більш широкий спектр поліморфізму.

Так, рестриктази BfaI і BssS1 дозволяли диференціювати генотипи BC067436, BC069780, HUMXYPFLA та NM\_000765, що свідчить про наявність у них сайту рестрикції цих ферментів (рис. 3, б).

За допомогою рестриктаз BspH1, CviAII, FatI, HpyCH4I, MslI, NlaIII та TspDTI, окрім генотипів BC067436, BC069780, HUMXYPFLA та NM\_000765, була можливість диференціювати генотип NM\_057095 (рис. 3, в), причому рестриктази CviAII, FatI, HpyCH4I, NlaIII та TspDTI здатні диференціювати генотип NM\_057095 від ге-

нотипів BC067436, BC069780, HUMXYPFLA та NM\_000765 (рис. 3, з), що свідчить про те, що у зразка 23 лише 1 сайт рестрикції, інші зразки відрізнялися за кількістю сайтів рестрикції. Рестриктаза BsrI здатна диференціювати генотипи AK223008, AK313813, BC033862, HUMCYPCN та NM\_000777 (рис. 3, д).

## Висновки

Таким чином, за допомогою біоінформаційних програм застосовано сучасний підхід до вивчення поліморфізму гена *сур3а4*. Показано високий рі-

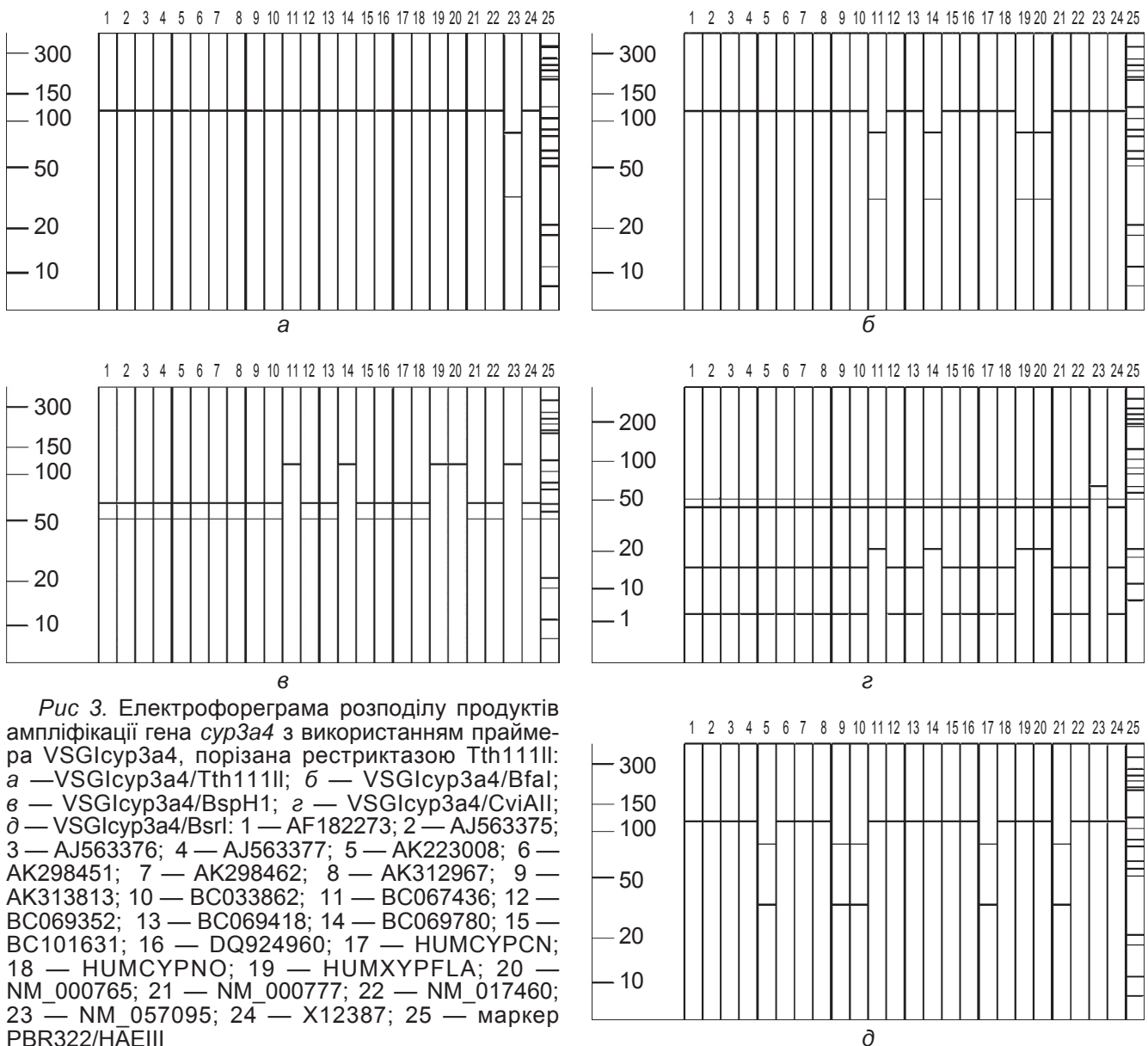


Рис. 3. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації гена *сур3а4* з використанням праймера VSGIсур3а4, порізана рестриктазою Tth111I: а — VSGIсур3а4/Tth111I; б — VSGIсур3а4/BfaI; в — VSGIсур3а4/BspH1; з — VSGIсур3а4/CviAII; д — VSGIсур3а4/BsrI: 1 — AF182273; 2 — AJ563375; 3 — AJ563376; 4 — AJ563377; 5 — AK223008; 6 — AK298451; 7 — AK298462; 8 — AK312967; 9 — AK313813; 10 — BC033862; 11 — BC067436; 12 — BC069352; 13 — BC069418; 14 — BC069780; 15 — BC101631; 16 — DQ924960; 17 — HUMCYPCN; 18 — HUMCYPNO; 19 — HUMXYPFLA; 20 — NM\_000765; 21 — NM\_000777; 22 — NM\_017460; 23 — NM\_057095; 24 — X12387; 25 — маркер PBR322/HAЕIII





вень поліморфізму гена, рівень його гомології сягає у середньому 75 %, переважно це одонуклеотидні заміни й інсерції/делеції. Така варіабельність гена може відобразити рівень поліморфізму людей за рівнем метаболізму ксенобіотиків. Створений дизайн праймера давав поліморфний продукт ампліфікації завдовжки 116 п. н., його поліморфізм був колінеарним варіабельності цілої послідовності. Використання ферментів рестрикції дозволило отримати продукти, що відрізнялися за розмірами на електрофореграмах. Найбільш перспективним є використання комбінації з рестриктаз BsrI та CviAII в *in vitro* рестриктазній реакції. Дані результати сприятимуть більш ефективному розв'язанню завдань, які ставляться перед фармакогенетикою.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Клиническая фармакогенетика* / Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, И. В. Игнатъев, В. Г. Кукес ; под ред. В. Г. Кукеса, Н. П. Бочкова. – М. : Гэотар-Медиа, 2007. – 248 с.
2. *Лукашов В. В.* Молекулярная эволюция и филогенетический анализ / В. В. Лукашов. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 256 с.
3. *Метаболизм лекарственных средств.* Научные основы персонализированной медицины : руководство / В. Г. Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская. – М. : Гэотар-Медиа, 2008. – 304 с.
4. *Chen X.* Influence of Various Polymorphic Variants of Cytochrome P450 Oxidoreductase (POR) on Drug Metabolic Activity of CYP3A4 and CYP2B6 / X. Chen, L. Pan, H. Naranmandura // *PLoS One*. – 2012. – N 7. – P. 121–127.
5. *Cohen N.* Pharmacogenomics and Personalized Medicine. Nadine / N. Cohen. – Humana Press, 2010. – 528 p.
6. *Lee C.* Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous

administration in rats: Possible role of CYP3A4 inhibition by pravastatin / C. Lee, J. Choi, T. Choi // *Indian J. Pharmacol.* – 2012. – N 44 (5). – P. 624–628.

7. *Lee C.* Effects of Fluvastatin on the Pharmacokinetics of Repaglinide: Possible Role of CYP3A4 and P-glycoprotein Inhibition by Fluvastatin / C. Lee, J. Choi, J. Seok // *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, 2013. – N 17 (3). – P. 245–251.

8. *Li D.* The Role of CYP3A4 mRNA Transcript with Shortened 3'-Untranslated Region in Hepatocyte Differentiation, Liver Development, and Response to Drug Induction (NCBI) [Electronic source] / D. Li, R. Gaedigk, S. N. Hart // *Mol. Pharmacol.* – 2012, Jan. – N 81 (1). – P. 86–96. PMID: PMC3250109 PMC3682086 – Access mode: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250109/>

9. *National Center for Biotechnological Information (NCBI)* [Electronic source]. – Access mode : [ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

10. *Needleman S. B.* A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S. B. Needleman, C. D. Wunsch // *Journal of Molecular Biology*. – 1970. – Vol. 48. – P. 443–453.

6. *Lee C., Choi J., Choi T.* Effects of pravastatin on the pharmacokinetic parameters of nimodipine after oral and intravenous administration in rats: Possible role of CYP3A4 inhibition by pravastatin. *Indian J Pharmacol* 2012; 44(5): 624-628.

7. *Lee C., Choi J., Seok J.* Effects of Fluvastatin on the Pharmacokinetics of Repaglinide: Possible Role of CYP3A4 and P-glycoprotein Inhibition by Fluvastatin. *Korean J Physiol Pharmacol* 2013; 17(3): 245-251.

8. *Li D., Gaedigk R., Hart S.N.* The Role of CYP3A4 mRNA Transcript with Shortened 3'-Untranslated Region in Hepatocyte Differentiation, Liver Development, and Response to Drug Induction. [NCBI]. *Mol Pharmacol* 2012; 81(1): 86-96. Access mode : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250109/>

9. *NCBI — National Center for Biotechnological Information* [NCBI]. — Access mode : [ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

10. *Needleman S. B., Wunsch C. D.* A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology* 1970; 48: 443-453.

Надійшла 4.07.2013

#### REFERENCES

1. *Sichev D.A., Ramenskaya G.V., Ignatyev I.V., Kukes V.G.* Klinicheskaya farmakogegetika [The clinical pharmacogenetics]. Moscow, Geotar-Media, 2007. 248 p.
2. *Lukashov V.V.* Molekularnaya evolutsiya i filogeneticheskiy analiz [Molecular evolution and phylogenetic analysis]. Moscow, BINOM, 2009. 256 p.
3. *Kukes V.G., Grachev S.V., Sichev D.A., Ramenskaya G. V.* Metabolism lekarstvennikh sredstv. Nauchnie osnovi personificirovannoy mediciny. [Metabolism of medical products. Scientific bases of the personalized medicine]. Moscow, Geotar-Media, 2008. 304 p.
4. *Chen X., Pan L., Naranmandura H.* Influence of Various Polymorphic Variants of Cytochrome P450 Oxidoreductase (POR) on Drug Metabolic Activity of CYP3A4 and CYP2B6. *PLoS One* 2012; 7: 121-127.
5. *Cohen N.* Pharmacogenomics and Personalized Medicine. Nadine, Humana Press 2010. 528 p.

