Анализ состава гетерозиготных генотипов CYP2C19 для определения цис и транс конфигурации

Jennifer M Skierka & John Logan Black

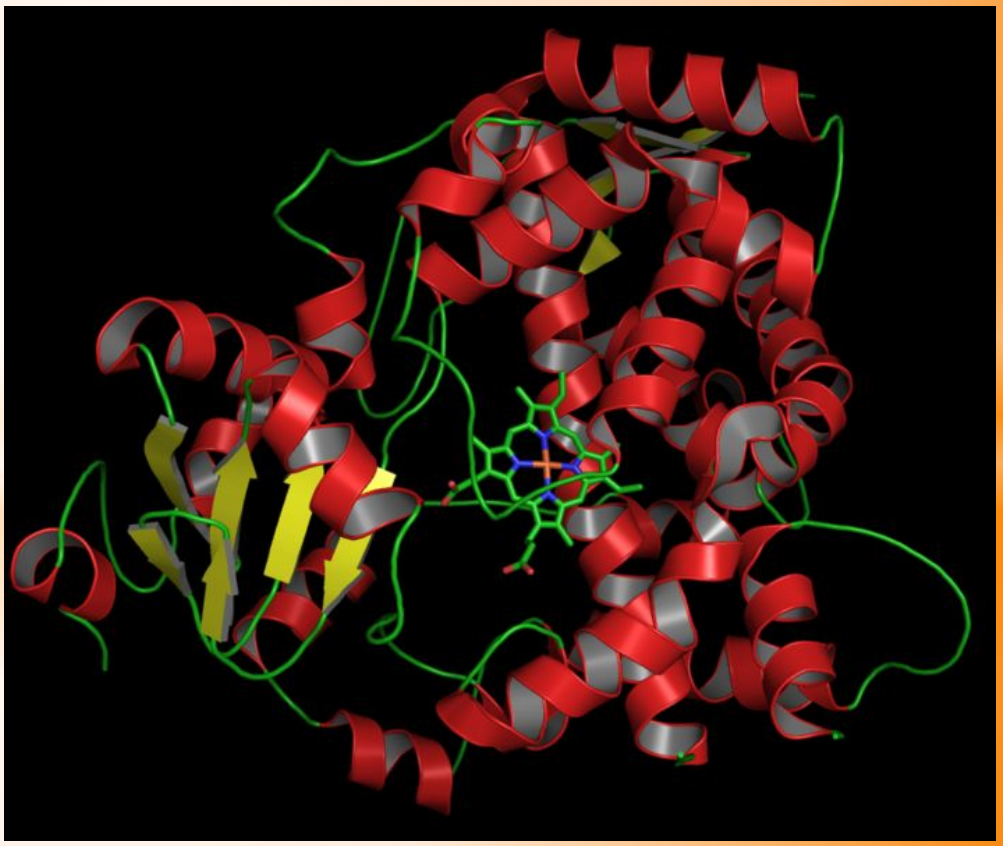
Personalized Genomics Laboratory, Department of Laboratory Medicine & Pathology, Mayo Clinic & Mayo Medical School

Немного о CYP450

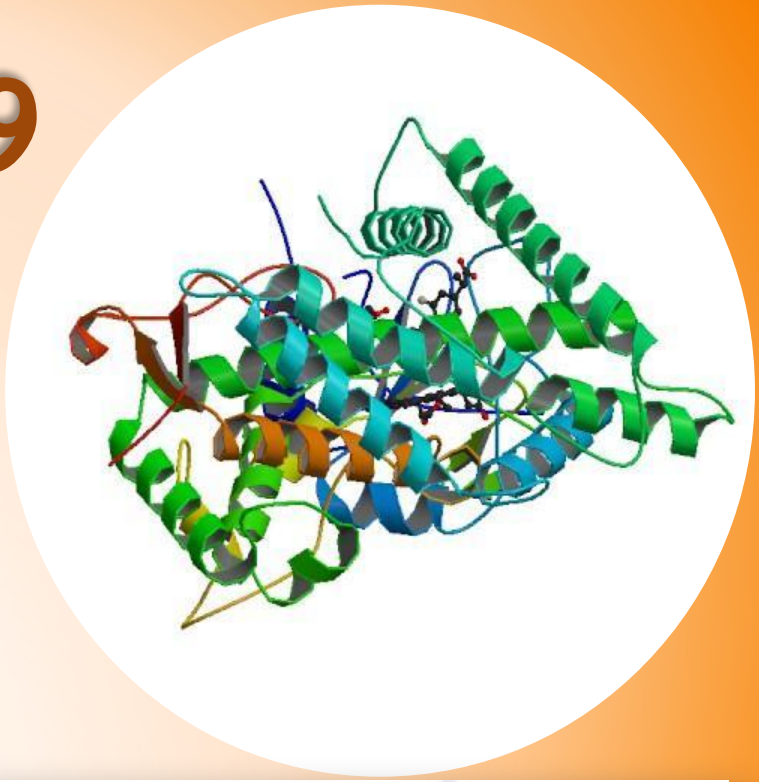
Цитохром P450 (CYP450) — большая группа ферментов, отвечающая за метаболизм чужеродных органических соединений и лекарственных препаратов.

•Ферменты семейства цитохрома P450 осуществляют окислительную биотрансформацию лекарственных препаратов и ряда других эндогенных биоорганических веществ.

•Все изоформы цитохрома P-450 объединены в семейства ***CYP1***, ***CYP2***, ***CYP3***. Внутри семейств выделены подсемейства A, B, C, D, E. В пределах подсемейств изоформы обозначены порядковым номером.

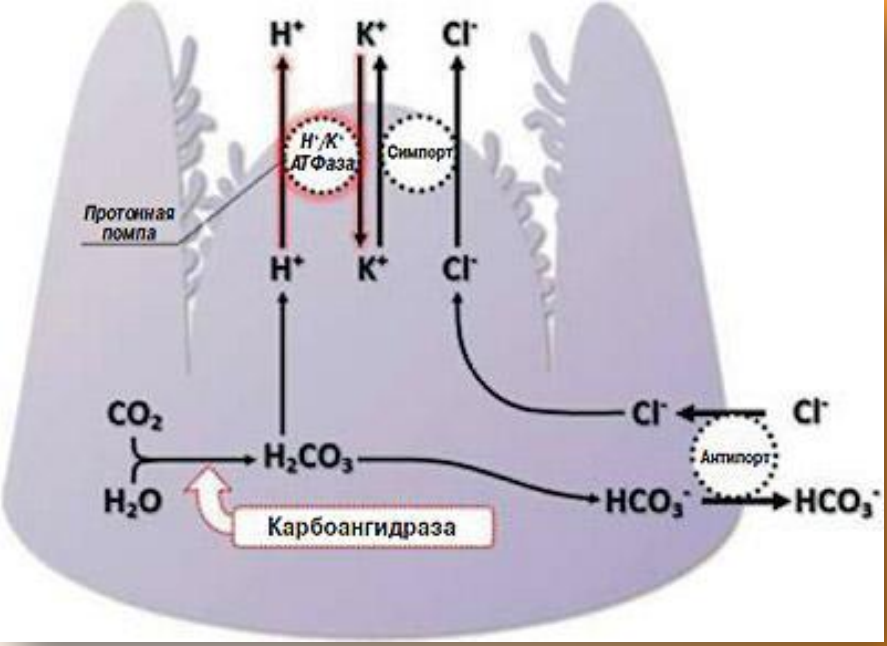


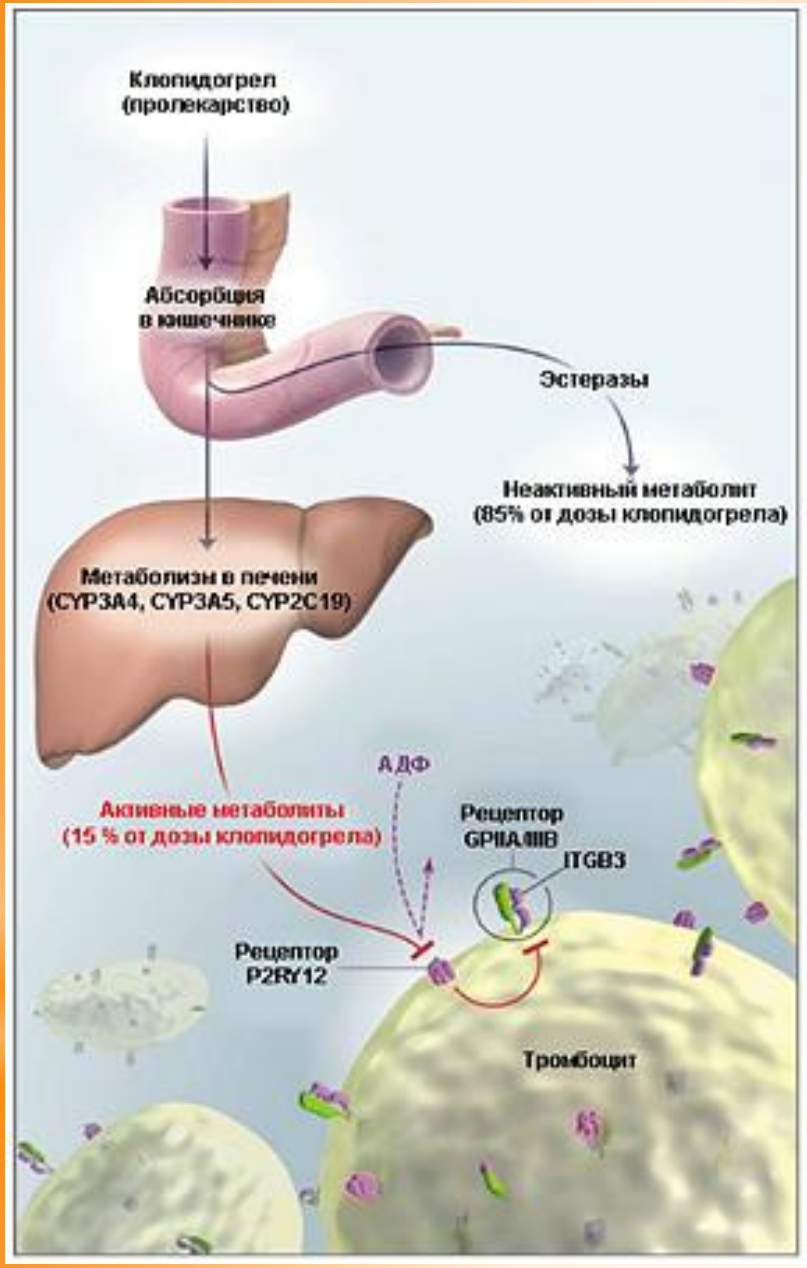
CYP2C19



- Цитохром *P450 2C19* - фермент, элемент многофункциональной системы оксидаз цитохрома P450.
- *CYP2C19* участвует в метаболизме ксенобиотиков, в том числе ингибиторов протонной помпы(блокаторов Н+/К+-АТФазы париетальных клеток слизистой оболочки желудка и уменьшающих, таким образом, секрецию соляной кислоты) и противоэпилептических средств (диазепам,фенитоин, фенобарбитал).
- В человеческом организме CYP2C19

  располагается в гепатоцитах.





Метаболизм клопидогрела

* CYP2C19 является ферментом печени, который действует на 5-10% лекарственных средств, исследованных на данный момент, в том числе на антикоагулянт - ***клопидогрел*** (плавикс), противоязвенные препараты (***омепразол, пантопразол, лансопразол, рабепразол и эзомепразол***), противосудорожные препараты (***мефенитоин***), противомалярийный ***прогуанил***, и анксиолитические (***диазепам***, ***нордазепам***, ***фенобарбитал***).

Метаболизм ингибиторов протонной помпы

* Большая часть генов CYP450 принадлежит 34 различным аллелям CYP2C19 . Треть из этих аллелей контролирует активность фермента (e.g.,*9) или его продуктов (e.g.,*2, *3, *4, *6, *7 и *8). Исключение составляет *17 аллель, которая ассоциирована с ростом транскрипционной активности.
* Частота встречаемости *17 аллели меняется этнически: начинается с 3% в Азии и повышается до 21% у русских.

Фенотипы CYP2C19

Фенотипы были разбиты на четыре категории:

* ультрабыстрые метаболизаторы (***UM***)
* быстрые (***EM***)
* средние (***IM***)
* недостаточные (***PM***).

У пациентов с генотипом «быстрых» метаболизаторов отмечается быстрый метаболизм ингибиторов протонной помпы, следовательно, антисекреторный эффект от приема последних имеет у них меньшую выраженность, чем у лиц с фенотипами «промежуточных» и «медленных» метаболизаторов.

*UM статус ассоциирован с увеличением активности фермента и содержал одну или две копии аллели *17. EM имели нормальную активность и имели дикий тип (*1/*1) генотипа - без мутаций (гомозиготы). IM имели среднюю активность фермента и несли одну нормально функционирующую аллель и одну аллель с потерей функции (*1) - мутация в одной аллели (гетерозиготы). PM имели низкую активность фермента и несли две аллели с потерянной функцией - мутации в обеих аллелях.

Цис-транс тест

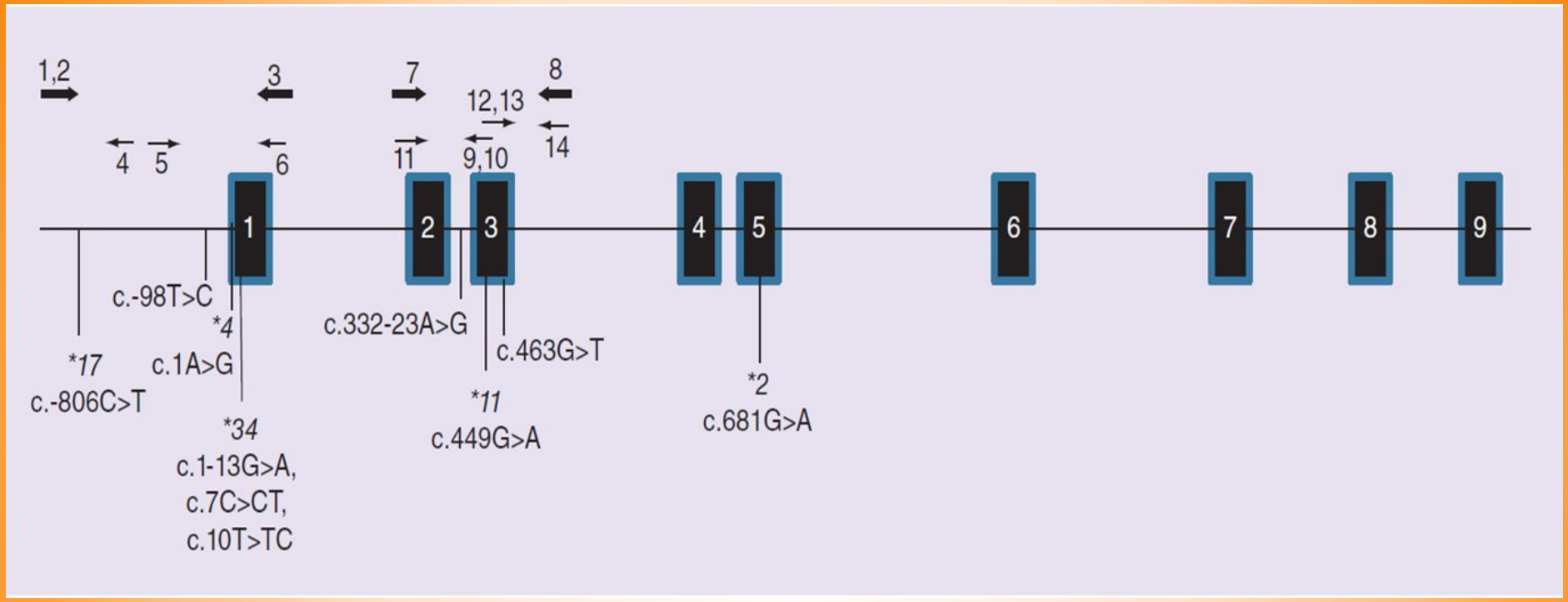
* Это генетический метод анализа, позволяющий выявить принадлежность рецессивных мутаций одному или разным генам.
* Для того, чтобы две мутации, а1 и а2 могли быть исследованы с помощью цис-транс-теста, они должны оказаться в одной клетке в одной из двух возможных конфигураций по отношению друг к другу.

Организм или клетку, несущую обе мутации в цис-положении, т.е. в одной хромосоме, называют ***цис-гетерозиготой***. Расположение этих мутаций в разных хромосомах одной пары (у эукариот) означает, что они находятся в транс-конфигурации в составе ***транс-гетерозиготы***.

* Для оценки частоты cis/trans соотношений между определенным составом мутаций гетерозигот в образцах у различных популяций, авторы разработали новый метод.
* Подмножество образцов, которые имели гетерозиготный состав, были оценены для определения их гаплотипа (совокупности аллелей на локусах одной хромосомы, обычно наследуемых вместе).

*Материалы и методы. Подбор образцов

* Геномную ДНК образцов экстрагировали ЭДТА –антикоагулянтом из образцов цельной крови на Qiagen EZ1 BioRobot с использованием рекомендованных протоколов (Qiagen Inc., CA, USA).
* Изучение CYP2C19 заключалось в двунаправленном секвенировании экзонов 1, 3, 4 и 5, или промоторов/интронов регионов: *2 (c.681G>A), *3 (c.636G>A), *4 (c.1A>G), *6 (c.395G>A, rs72552267), *7 (IVS5+2T>A, rs72558186), *8 (c.358T>A, rs41291556).



Образцы, в которых были найдены гетерозиготы для *2, *4, *11 или *17 аллелей (или были обнаружены в пределах первых 150 оснований от начала промотора , в экзоне 1 или экзоне 3) проходили дополнительную специфическую верификацию аллелей для установления cis/trans конфигурации.

* Оценка гаплотипов образцов, содержащих CYP2C19 * 2, * 4 и *17

* Функциональный вариант * 2 c.681G>A находится через 20 000 пар оснований от Т мутации * 17 c.-806C>. Авторы оценивали ориентацию * 2 аллеля по участку c.-98T> C (rs4986894). Из-за близости от * 4 аллеля также можно было оценить * 4 и *17 аллели, используя тот же метод.

* Для каждого образца две копии гена амплифицировали раздельно на сиквенс-специфической ПЦР. Один вариант содержал сиквенс спицефичский * 17 C (дикого типа) форвард (5´-AACCCTCA CTAAAGAATTT-GTGTCTTCTGTTCTCAAAGC-3´) и второй * 17 T (мутантного типа) (5´-AA TTTGTGTCTTCT TTCTCAAAGT-3´) форвард . Реверс праймер в обоих смесях совпадал.

* Обе ПЦР смеси включали: 25 ng гДНК, 0.5 µl каждый, 25 µM праймеров форвард и реверс, 5 µl 2X Failsafe Buffer D (Epicenter, WI, USA), 0.1 µl of Failsafe Enzyme mix (Epicenter) and 2.9 µl воды (Hyclone, UT, USA), общий объем смеси составлял 10. Обе реакции были проведены с использованием 9700 Thermal Cycler
* ПЦР-продукты были обработаны щелочной фосфатазой и экзонуклеазами, чтобы удалить любые несвязавшихся dNTP и праймеры, прежде чем перейти на секвенированию. Из каждой ПЦР было проведено шесть реакций секвенирования из образца (из каждого образца по две). Каждая смесь для секвенирования содержала: 1 µl ПЦР продукта, 5 µl воды(Hyclone), 1 µl по 10 µM сиквенс-праймеров, 1 µl BigDye® Terminator Mix v3 (Life Technologies), и 2 µl по 5X Sequencing Buffer (Life Technologiesдо общего объема в 10 µl.

*Секвенирование проводили в соответствии с BigDye® Terminator Sequencing протокола Life Technologies (Life Technologies). Последовательность праймеров были следующие: * 17 форвард 5'-TTT AACCCCCTAAAAAAACACG-3‘ (этот пример проверяется специфику связывания ПЦР праймера) промотер форвард 5'-GAGAACAAGACCAAA GGACATT-3'(200 оснований выше экзона 1) и промотер реверс 5'-GATATTTCCAATCACTGGGAGA GGA-3'(расположен в экзоне 1). Сиквенс хроматограммы для каждого образца анализировали с помощью Mutation Surveyor® (Soft-Genetics, LLC, PA, USA)

*В дополнение, был обнаружен 31 образец (1% от общего количества), который содержал гетерозиготный * 11 аллель. Из них 29 также содержали * 2, и шесть из них содержали * 2 * 11 и * 17 (включены в предыдущий этап). Из них 26 образцов (20, из которых содержали * 2 и * 11, а шесть * 2, * 11 и * 17) мы оценивали * 2 гаплотип ОНП c.332-23A> G (rs12769205), чтобы определить ориентацию между * 2 и * 11.

* Сиквенс-специфическая ПЦР проходила при тех же условиях, а смесь ПЦР включала аналогичные продукты, за исключением состава праймеров:
* Форвард 5´- CCATTTCCCACTGGCTGA A AGAG -3´
* Реверс 5´-ACATGAGCTAACAACCAG-GACTCCA-3´
* Затем продукты ПЦР разбавляли в 1000 раз и проводили вложенную сиквен-специфическую ПЦР. ПЦР праймер*11 реферс дикого типа 5´-GTGCCAG-C A AG ATC C A ATC TAG ATC A AC TC C TC - CACAAGGCAGC-3´ и реверс мутантного типа 5´- G TG C C AG C A AG ATC C A ATC TAG A T-CAACTCCTCCACAAGGCAGT-3´. Форвард праймер 5´- GGTAGCAGGATACGACTA TCGGC-CATTTCCCACTGGCTGAAAGAG-3´ с использовался одинакового состава.

* Условия ПЦР совпадали с предыдущим, разница заключалась в температурном режиме
* Один образец имел в * 2, * 17 гетерозиготу c.463G> T (p.E155X; rs374036992). Из-за возможного влияния на фенотип основываясь на основе хромосомной характеристики этих аллелей, авторы разработали аллель-специфическую ПЦР. Из-за гомологии последовательностей между CYP2C19 и CYP2C9 сначала проводили ПЦР для изоляции экзона 3 CYP2C19, а затем выполняется сиквенс-специфическая вложенная ПЦР с использованием новых праймеров.

ВЫВОД: поскольку речь идёт о рецессивных мутациях, цис-гетерозигота будет иметь дикий фенотип, независимо от того, находятся ли мутации в разных аллелях одного гена, или разных генах.

Мутации	Цис–положение	Транс–положение
Аллельные (в одном гене)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Мутант
Неаллельные (в разных генах)		
Фенотип гибрида	Дикий тип	Дикий тип

В транс-гетерозиготе результат будет различен. Если мутации расположены в разных генах, фенотип будет диким; если же обе мутации затрагивают одну единицу функции, возникает гомозигота с мутантным фенотипом, так как в гомологичных хромосомах мутантны одинаковые гены.