

Сравнительный анализ генов ортологичных белков цитохрома P450 2E1 человека и млекопитающих

Д. Р. Дуплий, О. В. Максимчук, В. П. Дуплий¹, Н. А. Чашин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

¹Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, Украина, 03680

duplijv@icbge.org.ua; duplijd@gmail.com

Цель. Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов ортологичных белков цитохрома P450 2E1 и установить связь эволюции гена с нуклеотидным составом. **Методы.** *In silico*: BLAST, ClustalW, MEGA4, PHP. **Результаты.** Изучены особенности общей филогении генов CYP2E1. Наибольшее родство транскрибируемой последовательности гена CYP2E1 *Homo sapiens* обнаружено с *Ran troglodytes*. Выявлено, что транзиция C → T встречается в интронах в 2,6 раза чаще, чем в экзонах. Установлена связь между кето-аминовой асимметрией генов CYP2E1 и эволюционным возрастом вида. **Выводы.** На примере CYP2E1 показано, что в течение эволюции интронный состав генов изменяется в сторону увеличения количества гуанина и тимина. Таким образом, величину кето-аминовой асимметрии можно использовать как дополнительный критерий эволюционного анализа.

Ключевые слова: цитохром P450 2E1, CYP2E1, транзиции, филогения, асимметрии нуклеотидного состава.

Введение. Мультигенное семейство цитохромов P450 является одним из наиболее интенсивно изучаемых, поскольку выполняет важную роль в метаболизме различных эндо- и экзогенных субстратов. Особый интерес представляет индуцируемая этанолом изоформа цитохрома P450 2E1 (CYP2E1) [1]. Индукция экспрессии CYP2E1 приводит к увеличению уровня генерируемых указанным ферментом кислородных радикалов, способных инициировать NADPH-зависимое перекисное окисление липидов. Вследствие этого нарушается окислительно-восстановительный баланс клетки и развивается окислительный стресс [2]. Взаимодействие генетических и средовых факторов вызывает тканеспецифические изменения синтеза и активности

CYP2E1, что вносит определенный вклад в патогенез заболеваний печени, поджелудочной железы и пр. [3–5]. В литературе есть сведения о влиянии экзогенных факторов на экспрессию CYP2E1 [6], в то время как действие генетических факторов на экспрессию фермента изучено недостаточно. С эволюционной точки зрения цитохром P450 является уникальным белком [7], сохранившимся от примитивных аэробов-прокариотов до человека. Учитывая, что про- и эукариоты дивергировали около 1,4 млрд лет назад, можно предположить наличие общего предшественника, существовавшего до этого момента, или, по крайней мере, считать дату дивергенции началом эволюции эукариотного цитохрома P450 [8].

Есть мнение, что первичная эволюционная функция цитохрома P450 в клетке состоит в его

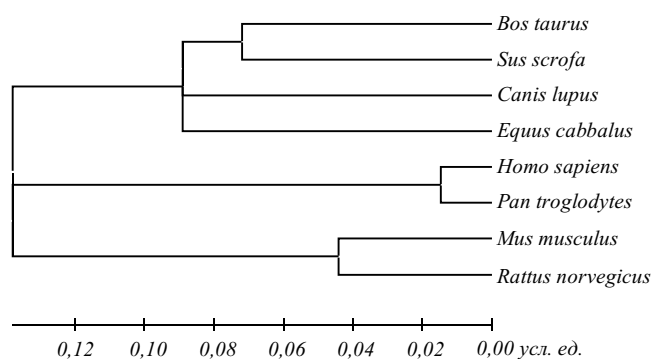


Рис. 1. Филогенетическое дерево последовательностей генов цитохромов P450 2E1 человека и семи млекопитающих

участии в пластическом и энергетическом обменах. А преимущественную специализацию по биотрансформации ксенобиотиков цитохром P450 приобрел около 800 млн лет назад, что совпадает со временем появления животных [8]. В представленной работе проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов ортологичных белков CYP2E1 человека и млекопитающих для восстановления эволюционной истории гена и особенностей мутационных событий.

Материалы и методы. В работе использованы данные геномных последовательностей CYP2E1 человека и семи млекопитающих (*Pan troglodytes XM_508139.2*, *Bos taurus NM_174530.2*, *Canis lupus NM_001003339.1*, *Equus caballus NM_001111303.1*, *Mus musculus NM_021282.2*, *Rattus norvegicus NM_031543.1*, *Sus scrofa NM_214421*) [9]. Первичное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей сравниваемых генов выполнено с помощью программ BLASTN [10] и ClustalW [11] соответственно; филогенетический анализ – с использованием пакета прикладных программ MEGA4 [12]. Расчет и анализ однонуклеотидных замен в структуре генов проведены с применением инструментария языка программирования PHP [13]. Показатель кето-аминовой асимметрии рассчитывали по формуле $K_{асим} = (N_G + N_T - N_A - N_C)/L$, где N_A, N_G, N_T, N_C – абсолютные количества соответствующих нуклеотидов на фрагменте длиной L ($L = N_A + N_G + N_T + N_C$) [14]. Для экзонов и интронов генов CYP2E1 вышеперечисленных видов рассчитаны средние арифметические $K_{асим}$, а также среднеквадратическая ошибка (погрешность) выборки

по формуле $CP_КВАДР_ОШ = \sqrt{s^2/N}$, где s^2 – дисперсия, N – размер выборки [15].

Результаты и обсуждение. Структура генов CYP2E1 большинства исследуемых млекопитающих идентична и состоит из девяти экзонов и восьми интронов. У всех видов описано по единственному варианту мРНК CYP2E1, в которой транслируемая последовательность гена начинается в первом экзоне и заканчивается в терминальном. Несмотря на одинаковое количество экзонов, размер CYP2E1 у разных видов отличается за счет неодинаковой протяженности интронов. Так у *H. sapiens* отмечена наибольшая длина шестого интрона (из-за повторяющейся GGG-последовательности примерно 576 п. н.), а у *M. musculus* – второго интрона. Обращает внимание структурное сходство интронных частей CYP2E1 *R. norvegicus* и *M. musculus*, у которых обнаружено 86 % сходства между последовательностями вторых и шестых интронов и 93 % – между четвертыми.

Для восстановления эволюционной истории гена цитохрома P450 2E1 выполнены множественные выравнивания транслируемых последовательностей генов и построено филогенетическое дерево (рис. 1).

Как видно из данных рис. 1, эволюция гена CYP2E1 претерпела несколько дивергенций, в частности, прослеживаются независимые пути развития генов у грызунов, приматов и прочих млекопитающих. Проанализированные гены CYP2E1 имеют общего предка еще до разделения отрядов грызунов и приматов, то есть около 70 млн лет назад [8].

Для установления изменений нуклеотидного состава исследуемых генов в течение эволюции проведены попарные выравнивания экзонных и интронных последовательностей гена CYP2E1 каждого вида относительно гена CYP2E1 человека, а также проанализированы частоты однонуклеотидных замен в гомологичных сайтах. Оценивали 12 возможных типов однонуклеотидных замен. Следует отметить, что обнаружены существенные различия в частотах отдельных типов замен в экзонных и интронных частях генов. Так, транзиция А → Г наблюдается чаще, чем Т → С, а G → А – чаще, чем С → Т. Полученные результаты приведены в таблице. Вы-

Суммарные частоты мутационных событий в гене *CYP2E1*

Название вида, сравнимого с <i>Homo sapiens</i>	Частоты однонуклеотидных замен				
	Транзиции	Трансверсии	Всего замен	Инсерции	Делеции
Экзоны					
<i>Pan troglodytes</i>	0,014	0,011	0,025	0,067	0,003
<i>Sus scrofa</i>	0,111	0,092	0,203	0,035	0,000
<i>Bos taurus</i>	0,107	0,087	0,194	0,108	0,000
<i>Canis upus</i>	0,119	0,098	0,217	0,045	0,004
<i>Equus cabbalus</i>	0,110	0,081	0,192	0,045	0,035
<i>Mus musculus</i>	0,132	0,095	0,227	0,054	0,001
<i>Rattus norvegicus</i>	0,128	0,088	0,217	0,000	0,017
Интроны					
<i>Pan troglodytes</i>	0,025	0,024	0,049	0,081	0,001
<i>Sus scrofa</i>	0,211	0,235	0,446	0,078	0,029
<i>Bos taurus</i>	0,200	0,196	0,396	0,017	0,143
<i>Canis lupus</i>	0,198	0,213	0,411	0,010	0,185
<i>Equus cabbalus</i>	0,208	0,223	0,431	0,037	0,048
<i>Mus musculus</i>	0,236	0,265	0,501	0,015	0,074
<i>Rattus norvegicus</i>	0,198	0,187	0,386	0,013	0,142

явлено, что в гомологичных сайтах интронов замен больше, чем в экзонах. При этом транзиции в экзонах на 23 % превосходят трансверсии. В интронах отмечено небольшое (около 5 %) преобладание трансверсий за счет перехода G → C, что, возможно, связано с видовыми особенностями CpG-богатых областей, в которых расположен *CYP2E1*, и этот факт требует углубленного исследования.

В ранее опубликованной работе нами обнаружены устойчивые различия нуклеотидных соотношений в разных функциональных фрагментах гена [14]. Так, в интронах зафиксированы высокие значения кето-аминовой асимметрии нуклеотидного состава ($K_{асим}$), отражающей преобладание нуклеотидов, наиболее часто подвергающихся заменам в результате спонтанного мутагенеза. Формально $K_{асим} = (N_G + N_T - N_A - N_C)/L$, где N_A, N_G, N_T, N_C – абсолютные количества соответствующих нуклеотидов на фрагменте длиной L ($L = N_A + N_G + N_T + N_C$). Чтобы проверить, как изменяется величина $K_{асим}$ в течение

эволюции, мы рассчитали $K_{асим}$ интронов и экзонов *CYP2E1* каждого вида и сравнили с ранее полученными данными. На рис. 2 показана динамика изменения величины $K_{асим}$ в зависимости от эволюционного родства нуклеотидных последовательностей.

Из рис. 2, а, следует, что у эволюционно отдаленных от человека видов величины $K_{асим}$ экзонов не меняют знака и близки у восьми видов млекопитающих. В отличие от этого величина $K_{асим}$ интронов в процессе эволюции увеличивается (рис. 2, б) от $-0,041 \pm 0,021$ (*M. musculus*) и $-0,042 \pm 0,032$ (*B. taurus*) до $0,004 \pm 0,016$ у *P. troglodytes*, а у *H. sapiens* достигает $0,017 \pm 0,027$. Этот факт можно объяснить накоплением тимина и гуанина в локусах наименьшего давления отбора. На рис. 3 показаны величины $K_{асим}$ в зависимости от эволюционного возраста биологического вида.

Таким образом, величина $K_{асим}$ представляет интерес для дальнейшего исследования, так как мо-

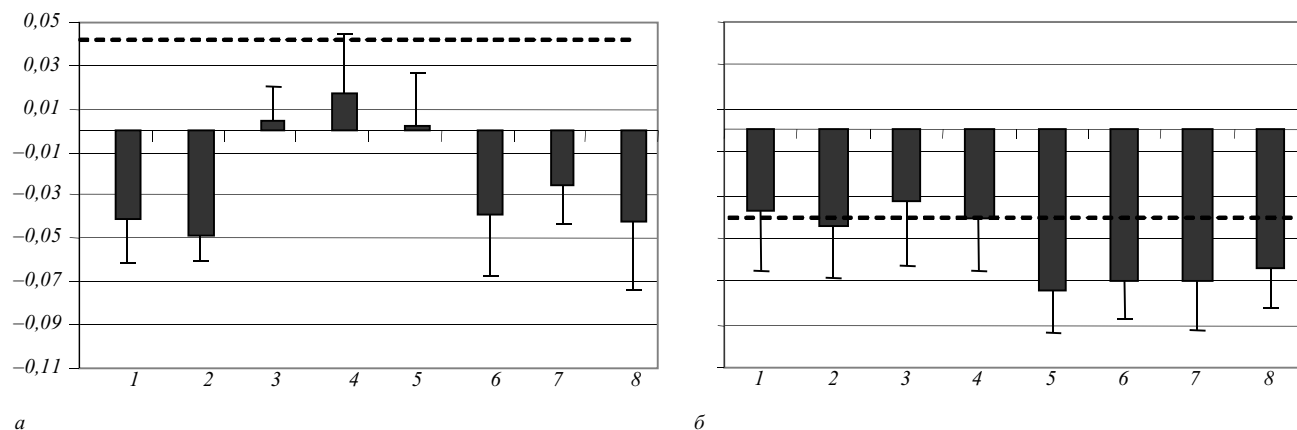


Рис. 2. Величини $K_{асим}$ в інтронах (а) і екзонах (б) генів *CYP2E1* восьми млекопитаючих. По осі абсцисс розположені біологічні види в порядку їх родства з геном *CYP2E1*: 1 – *Mus musculus*; 2 – *Rattus norvegicus*; 3 – *Pan troglodytes*; 4 – *Homo sapiens*; 5 – *Equus caballus*; 6 – *Canis lupus*; 7 – *Sus scrofa*; 8 – *Bos taurus*. По осі ординат указані відповідні середні величини і стандартні погрешности $K_{асим}$ для інтронів (а) і екзонів (б). Пунктирною лінією отмечены середні величини $K_{асим}$ для 10839 генів людини [14]

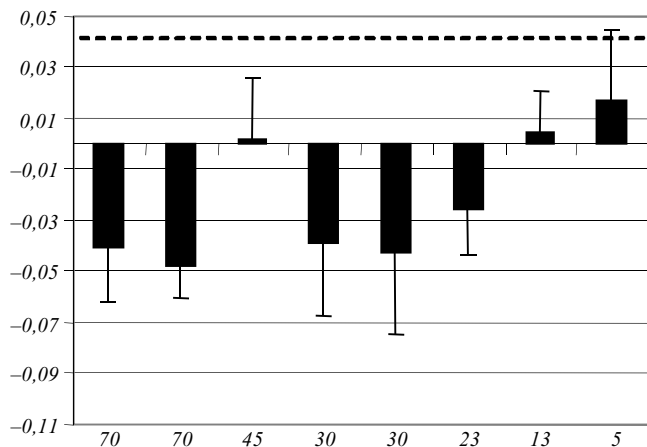


Рис. 3. Величини $K_{асим}$ в інтронах генів *CYP2E1* восьми млекопитаючих. По осі абсцисс указано приблизительное время дивергенции (млн лет) біологічних видів [16]: 70 – *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*; 45 – *Equus caballus*; 30 – *Bos taurus*; *Canis lupus*; 23 – *Sus scrofa*; 13 – *Pan troglodytes*; 5 – *Homo sapiens*. На осі ординат приведені відповідні середні величини $K_{асим}$ і середньквдратическіе ошибки

жет служити додатковим критерієм оцінки еволюційного віку нуклеотидної послідовності.

Проведений аналіз генів ортологічних білків цитохрому P450 2E1 дозволив описати загальні закономірності філогенії досліджуваних генів *CYP2E1* і встановити точки дивергенції у *Equus caballus*, *Canis lupus* і приматів. Серед однонуклеотидних заміни в інтронах генів *CYP2E1* найбільше

частим подією є транзиції, складають 48 % всіх типів однонуклеотидних заміни.

Duplij D. R., Maksymchuk O. V., Duplij V. P., Chaschin N. A.

Comparative analysis of human and mammalia genes of protein ortologs of cytochrome P450 2E1

Summary

Aim. To carry out a comparison analysis of nucleotide sequences for cytochrome P450 2E1 protein ortologs genes and reestablish a connection of gene evolution with nucleotide content. **Methods.** In silico: BLAST, ClustalW, MEGA4, PHP. **Results.** A general phylogeny of *CYP2E1* genes is described. The most affinity is found for human translated sequences with *Pan troglodytes*. The transition C>T is the most often, it occurs in introns in 2.6 more times than in exons. The correlation of keto-amino skew of *CYP2E1* genes and evolution age of species. **Conclusions.** The analysis carried out in our paper allows us to assume that a common ancestor of *CYP2E1* protein isoform lived before divergence between rodent and Primates orders, i.e. 70 millions years ago. The single nucleotide substitution are accumulated in introns during evolution.

Key words: cytochrome P450 2E1, *CYP2E1*, transition, phylogeny, nucleotide composition skew.

Д. Р. Дулій, О. В. Максимчук, В. П. Дулій, Н. А. Чащин

Порівняльний аналіз генів ортологічних білків цитохрому P450 2E1 людини і ссавців

Резюме

Мета. Провести порівняльний аналіз нуклеотидних послідовностей генів ортологічних білків цитохрому P450 2E1 і встановити зв'язок еволюції гена з нуклеотидним складом. **Методи.** In silico: BLAST, ClustalW, MEGA4, PHP. **Результати.** Описано особливості загальної філогенії генів *CYP2E1*. Найбільшу спорідненість трансльованої послідовності гена

CYP2E1 Homo sapiens виявлено з *Pan troglodytes*. Визначено, що транзиція С Т зустрічається в інтронах у 2,6 разу частіше, ніж в екзонах. Встановлено зв'язок між кето-аміновою асиметрією генів *CYP2E1* і еволюційним віком виду. **Висновки.** На прикладі *CYP2E1* показано, що впродовж еволюції нуклеотидний склад інтронів змінюється у напрямку збільшення кількості гуаніну і тиміну. Таким чином, величину кето-амінової асиметрії можна використовувати як додатковий критерій еволюційного аналізу.

Ключові слова: цитохром P450 2E1, *CYP2E1*, транзиції, філогенія, асиметрія нуклеотидного складу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Chen Q., Galleano M., Cederbaum A. I. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cell overexpressing human cytochrome P4502E1 // J. Biol. Chem.–1997.–**272**, N 23.–P. 14532–14541.
2. Wu D., Cederbaum A. I. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1 // Toxicol. Appl. Pharmacol.–2005.–**207**, N 2 (suppl.)–P. 70–76.
3. Botto F., Seree E., el Khyari S., de Sousa G., Massacrier A., Placidi M., Cau P., Pellet W., Rahmani R., Barra Y. Tissue specific expression and methylation of the human *CYP2E1* gene // Biochem. Pharmacol.–1994.–**48**, N 6.–P. 1095–1103.
4. Danko I. M., Chaschin N. A. Association of CYP2E1 gene polymorphism with predisposition to cancer development // Exp. Oncol.–2005.–**27**, N 4.–P. 248–256.
5. Sidorik L., Kyuyamova R., Bobyk V., Kapustjan L., Rozhko O., Vigontina O., Ryabenko D., Danko I., Maksymchuk O., Kovalenko L., Chaschin N. Molecular chaperon, HSP60, and cytochrome P450 2E1 co-expression in dilated cardiomyopathy // Cell Biol. Int.–2005.–**29**, N 1.–P. 51–55.
6. Maksymchuk O. V., Bobyk V. I., Sydoryk L. L., Chashchyn M. O. Influence of long-term combined gamma-radiation and ethanol on cytochrome P450 2E1 expression in the mice liver // Ukr. Biokhim. Zhur.–2008.–**80**, N 5.–P. 105–111.
7. Danko I. M., Odynets K. A., Kitam V. O., Chaschin N. A. Computer modeling of cytochrome P450 2E1 three-dimensional structure // Ukr. Biokhim. Zhur.–2006.–**78**, N 2.–P. 154–162.
8. Nelso D. R., Strobel H. W. Evolution of cytochrome P450 proteins // Mol. Biol. Evol.–1987.–**4**, N 6.–P. 572–593.
9. Web-resource: ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/genomes/
10. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. Basic local alignment search tool. // J. Mol. Biol.–1990.–**215**, N3.–P. 403–410.
11. Larkin M. A., Blackshields G., Brown N. P., Chenna R., McGettigan P. A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., Thompson J. D., Gibson T. J., Higgins D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics.–2007.–**23**, N 21.–P. 2947–2948.
12. Koterov D. V., Kostarev A. F. PHP 5 v podlinnikе.–Sankt-Petersburg: BHV, 2006.–1120 p.
13. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 // Mol. Biol. Evol.–2007.–**24**, N 8.–P. 1596–1599.
14. Duplij D. R., Kalashnikov V. V., Chashin N. A., Tolstorukov M. Y. Comparative analysis of base-pair composition bias in exons and introns of human genes // Biopolym. cell.–2008.–**24**, N 5.–P. 1–9.

УДК 577.3

Поступила в редакцію 06.04.10