

ГЕНЫ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОГО АПОПТОЗА КАК КАНДИДАТЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ СВЯЗИ С ЛИМФЕДЕМОЙ

О.В. Сайк¹, мл. науч. сотр.

В.В. Нимаев², доктор мед. наук, зав. лаб.

Д.Б. Усмонов³, ординатор

П.С. Деменков¹, канд. техн. наук, науч. сотр.

И.Н. Лаврик^{1,4}, канд. биол. наук, профессор, зав. лаб.

В.А. Иванисенко¹, канд. биол. наук, доцент, зав. лаб.

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

²Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН

³ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации

⁴Магдебургский университет имени Отто фон Гуерике

¹ (Россия, г. Новосибирск)

² (Россия, г. Новосибирск)

³ (Россия, г. Новосибирск)

⁴ (Германия, г. Магдебург)

DOI: 10.24411/2500-1000-2018-10056

Аннотация. В настоящее время от лимфедемы в мире страдает более 150 млн человек. Данное заболевание характеризуется высокобелковым отеком различных частей тела, вызванным нарушениями лимфатического оттока. Молекулярно-генетические основы патогенеза лимфедемы в настоящее время изучены не полностью. Нарушение эндотелиального апоптоза называют в числе факторов, вовлеченных в развитие лимфедемы. В данной работе с помощью программы TopGene был проведен поиск генов кандидатов для генотипирования при поиске ассоциаций с лимфедемой из числа участников эндотелиального апоптоза. В качестве наиболее приоритетных генов были выявлены *KDR*, *TEK*, *MAP3K5*, *ABL1*, *PLCG1*, *CCL2*, *FASLG*, *DAB2IP*, *ICAM1* и *SERPINE1*.

Ключевые слова: эндотелиальный апоптоз, лимфедема, приоритизация генов, TopGene, кандидаты для генотипирования.

Приоритизация генов эндотелиального апоптоза выполнена при поддержке гранта РНФ «Программируемая клеточная гибель, индуцируемая через рецепторы смерти: идентификация молекулярных механизмов инициации апоптоза с помощью молекулярного моделирования» №14-44-00011.

Анализ патологических механизмов лимфедемы проводился при поддержке НИР № 0324-2018-0005 «Исследование механизмов и маркеров нарушения гемолимфоциркуляции при хирургических, гинекологических заболеваниях, первичной и вторичной патологии лимфатической системы, для разработки персонафицированных клеточных и малоинвазивных технологий коррекции».

Лимфедема – хроническое прогрессирующее заболевание, приводящее к значительной потере трудоспособности, которым страдают более 150 млн чел. во всем мире [1]. В основе патогенеза лимфедемы

лежит появление хронического высокобелкового отека, характеризующегося патологическим накоплением межклеточной жидкости с крупномолекулярными белками в интерстициальном пространстве

вследствие дефекта лимфатического дренажа, вызванного врожденным пороком (первичная лимфедема), лимфатической обструкцией или разрушением лимфатических сосудов (вторичная лимфедема). Длительное существование высокобелкового отека вызывает хроническое воспаление, ведущее к замещению жировой ткани соединительной, увеличению объема соединительнотканного матрикса, что впоследствии приводит не только к увеличению объема частей тела, но и к вторичному нарушению лимфатического транспорта и дренажа [2]. Одной из вероятных причин клинической манифестации первичной лимфедемы в среднем возрасте и развития вторичной лимфедемы после лечения рака молочной железы может являться апоптоз эндотелия, роль которого обсуждается в ряде публикаций о патогенезе лимфедемы [3, 4].

Апоптоз является одной из форм клеточной гибели и характеризуется рядом морфологических и молекулярных особенностей, в том числе: экспозиция на клеточной мембране фосфатидилсерина, блэббинг плазматической мембраны, сжатие клеток, перегруппировка цитоскелета, коллапс ядра, конденсация хроматина, фрагментация ДНК и образование «апоптотических телц» [5]. Апоптоз необходим для устранения поврежденных, старых, вредных, раковых или инфицированных клеток. Апоптоз также играет важную роль в поддержании тканевого гомеостаза и в эмбриональном развитии [6]. Апоптоз может вызываться внешними воздействиями (например, лигандами смерти, ультрафиолетом и γ -излучением) и/или внутренними факторами (например, окислительным стрессом, повреждением ДНК, повышенным содержанием Ca^{2+}). Известны два основных пути апоптоза: внешний, опосредованный рецепторами клеточной смерти, и внутренний митохондриальный путь [7, 8]. Нарушения апоптоза связаны со многими заболеваниями, включая раковые, нейродегенеративные, аутоиммунные, воспалительные и другие [9]. В ряде работ обсуждается роль апоптоза эндотелия в патогенезе лимфедемы [3, 4], однако, анализ связи между генами, во-

влеченными в эндотелиальный апоптоз, и генами, ассоциированными с лимфедемой, ранее не проводился.

В данной работе проведена приоритизация генов эндотелиального апоптоза как кандидатов для генотипирования при поиске генов, ассоциированных с лимфедемой.

Результаты и обсуждение. Одним из эффективных и часто используемых методов установления потенциальных ассоциаций генов с заболеваниями является приоритизация [10]. Учитывая важную роль апоптоза клеток эндотелия в патогенезе лимфедемы [3, 4], нами в данной работе была проведена приоритизация генов, вовлеченных в Gene Ontology биологический процесс «endothelial cell apoptotic process» (GO:0072577) с использованием обучающей выборки, включающей гены, ассоциированные с лимфедемой.

Для приоритизации использовалась программа TopGene [10]. Программа TopGene позволяет на основе обучающего набора генов отранжировать тестовый набор генов, согласно определенным критериям, характеризующим близость генов из тестового набора к генам из обучающей выборки. Методы данных ресурсов используют как свойства вершин графа сетей белок-белок взаимодействий, генетическую информацию (ко-локализация в геноме), функциональные свойства генов (участие в одних и тех же GO категориях) и др. В качестве обучающего набора для каждого из этих методов подавался список генов, ассоциированных с лимфедемой. Список генов, ассоциированных с лимфедемой, был составлен на основе анализа информации из баз данных CTD (<http://ctdbase.org/>), Malacards (<https://www.malacards.org/>), KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/disease/>), HPO (<https://hpo.jax.org/>), DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>) и ANDSysTem [11] и включал 69 генов. В качестве тестового набора использовался список генов, вовлеченных в эндотелиальный апоптоз. Список из 64 генов человека, вовлеченных в эндотелиальный апоптоз (Gene Ontology биологический процесс «endothelial cell apoptotic process»), был получен с помо-

щью системы AmiGO [12] по запросу «GO:0072577» с фильтром Organism: «Homo sapiens». При использовании TopGene в разделе «Training parameters» были выбраны все «Feature». Для ранжирования генов использовался показатель «Rank» выдачи программы TopGene.

Оказалось, что два гена GATA2 и KDR одновременно присутствуют в списке генов «endothelial cell apoptotic process», а

также генов, ассоциированных с лимфедемой [13, 14]. При приоритизации эти два гена были исключены из числа генов обучающего набора и считались контрольными генами. Таким образом, приоритизация проводилась для 64 генов из тестового набора и 67 генов из обучающей выборки, ассоциированных с лимфедемой. Десять наиболее приоритетных генов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Десять наиболее приоритетных генов, вовлеченных в эндотелиальный апоптоз, которые являются перспективными кандидатами для изучения их связи с лимфедемой

Ранг	Символ гена	Название гена	Идентификатор Gene ID	Статистическая значимость (p-value)
1	KDR	Киназный инертный доменный рецептор	3791	3,63E-07
2	TEK	Ангиопоэтин-1 рецептор	7010	1,42E-06
3	MAP3K5	Митоген-активируемая белковая киназа киназы киназы 5	4217	1,62E-06
4	ABL1	Онкоген ABL1	25	2,27E-06
5	PLCG1	Фосфолипаза C гамма 1	5335	7,58E-06
6	CCL2	Моноцитарный хемотаксический белок 1	6347	1,35E-05
7	FASLG	Fas-лиганд	356	1,59E-05
8	DAB2IP	ASK1-взаимодействующий белок 1	153090	1,97E-05
9	ICAM1	Межклеточная молекула адгезии 1	3383	2,29E-05
10	SERPINE1	Ингибитор активатора плазминогена 1	5054	2,50E-05

Наиболее приоритетным геном оказался контрольный ген KDR, кодирующий киназный инертный доменный рецептор (таблица 1). KDR является одним из главных регуляторов роста эндотелиальных клеток [15], который обеспечивает их выживаемость [16], пролиферацию, миграцию [17], рост [18] и морфогенез [19]. Известно, что ряд полиморфизмов в этом гене ассоциирован с повышенным риском развития лимфедемы – отношение шансов составляет больше 2 при $p\text{-value} < 0.05$ [14]. В модели на хвостах мышей было показано, что при низкоуровневой лазерной терапии экспрессия гена KDR была повышена по сравнению с контрольной группой [20].

Второе место занял ангиопоэтин-1 рецептор TEK, связанный с развитием эмбриональных сосудов [21]. На третьем месте оказалась митоген-активируемая белковая киназа киназы киназы 5 (MAP3K5). Четвертое место было у протонкогена ABL1, кодирующего протеин-

тирозинкиназу важную для клеточного деления и дифференцировки, а также адгезии и реакции на окислительный стресс [22]. На пятой строчке в таблице стоит ген фосфолипазы C гамма 1 (PLCG1). Мутации в гене PLCG1 могут приводить к нарушению эндотелиального апоптоза [23], а также ассоциированы с ангиосаркомой, которая может возникнуть вторично, как осложнение хронической лимфедемы [24]. На шестом месте оказался ген CCL2 (моноцитарный хемотаксический белок 1), кодирующий цитокин, обладающий хемотаксической активностью для моноцитов [25] и базофилов [26]. Седьмую строчку занял ген FASLG - член надсемейства фактора некроза опухоли, участвующий в активации апоптоза через связывание с FAS [27]. На восьмой позиции стоит ASK1-взаимодействующий белок 1 (DAB2IP), который является опухолевым супрессором. На девятом месте оказался ген межклеточной молекулы адгезии 1 (ICAM1), который кодирует гликопротеин клеточ-

ной поверхности, широко экспрессирующийся в эндотелиальных клетках и клетках иммунной системы. Последнюю строчку в таблице 1 занял SERPINE1 - ингибитор тканевого активатора плазминогена и урокиназы [28], вовлеченный в фибринолиз [29].

Закключение. Таким образом, в данной работе осуществлен поиск новых потенциальных участников молекулярно-генетических механизмов лимфедемы на основе приоритизации генов, вовлеченных

в эндотелиальный апоптоз. Выявленные приоритетные гены (KDR, TEK, MAP3K5, ABL1, PLCG1, CCL2, FASLG, DAB2IP, ICAM1 и SERPINE1) из числа генов, вовлеченных в эндотелиальный апоптоз, могут быть использованы при планировании экспериментов по установлению их ассоциаций с лимфедемой. Кроме того, анализ функции данных генов может помочь в понимании молекулярно-генетической роли эндотелиального апоптоза в лимфедеме.

Библиографический список

1. *Farinola N., Piller N. B.* CYP2A6 polymorphisms: is there a role for pharmacogenomics in preventing coumarin-induced hepatotoxicity in lymphedema patients? // *Pharmacogenomics.* – 2007. – 8. №12. – С. 151-158.
2. *Повещенко А.Ф., Нумаев В.В., Любарский М.С., Коненков В.И.* Медицинские и генетические аспекты лимфедемы // *Медицинская генетика.* – 2010. – Т. 9. – №9 (99). – С. 3-9.
3. *Olszewski W. L.* Pathophysiological aspects of lymphedema of human limbs: I. Lymph protein composition // *Lymphatic research and biology.* – 2003. – Т. 1. – №. 3. – С. 235-243.
4. *Tian W, Rockson SG, Jiang X, Kim J, Begaye A, Shuffle EM, Tu AB, Cribb M, Nepiyushchikh Z, Feroze AH, Zamanian RT.* Leukotriene B4 antagonism ameliorates experimental lymphedema // *Science translational medicine.* – 2017. – Т. 9. – №. 389. – С. eaal3920.
5. *Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics // *British journal of cancer.* – 1972. – Т. 26. – №. 4. – С. 239.
6. *Chambers E., Rounds S., Lu Q.* Pulmonary Endothelial Cell Apoptosis in Emphysema and Acute Lung Injury // *Molecular and Functional Insights Into the Pulmonary Vasculature.* – Springer, Cham, 2018. – С. 63-86.
7. *Olson M., Kornbluth S.* Mitochondria in apoptosis and human disease // *Current molecular medicine.* – 2001. – Т. 1. – №. 1. – С. 91-122.
8. *Thorburn A.* Death receptor-induced cell killing // *Cellular signalling.* – 2004. – Т. 16. – №. 2. – С. 139-144.
9. *Hetts S. W.* To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease // *Jama.* – 1998. – Т. 279. – №. 4. – С. 300-307.
10. *Chen J, Bardes EE, Aronow BJ, Jegga AG.* ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization // *Nucleic acids research.* – 2009. – Т. 37. – №. suppl_2. – С. W305-W311.
11. *Ivanisenko VA, Saik OV, Ivanisenko NV, Tiys ES, Ivanisenko TV, Demenkov PS, Kolchanov NA.* ANDSytem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology // *BMC systems biology.* – 2015. – Т. 9. – №. 2. – С. S2.
12. *Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, AmiGO Hub, Web Presence Working Group.* AmiGO: online access to ontology and annotation data // *Bioinformatics.* – 2008. – Т. 25. – №. 2. – С. 288-289.
13. *Kazenwadel J, Secker GA, Liu YJ, Rosenfeld JA, Wildin RS, Cuellar-Rodriguez J, Hsu AP, Dyack S, Fernandez CV, Chong CE, Babic M.* Loss-of-function germline GATA2 mutations in patients with MDS/AML or MonoMAC syndrome and primary lymphedema reveal a key role for GATA2 in the lymphatic vasculature // *Blood.* – 2011. – С. blood-2011-08-374363.
14. *Newman B, Lose F, Kedda MA, Francois M, Ferguson K, Janda M, Yates P, Spurdle AB, Hayes SC.* Possible genetic predisposition to lymphedema after breast cancer // *Lymphatic research and biology.* – 2012. – Т. 10. – №. 1. – С. 2-13.

15. Liu Z, Qi L, Li Y, Zhao X, Sun B. VEGFR2 regulates endothelial differentiation of colon cancer cells // BMC cancer. – 2017. – Т. 17. – №. 1. – С. 593.
16. Ou JM, Yu ZY, Qiu MK, Dai YX, Dong Q, Shen J, Dong P, Wang XF, Liu YB, Quan ZW, Fei ZW. Knockdown of VEGFR2 inhibits proliferation and induces apoptosis in hemangioma-derived endothelial cells // European journal of histochemistry: EJH. – 2014. – Т. 58. – №. 1.
17. Liu Y, Qiao Y, Hu C, Liu L, Zhou L, Liu B, Chen H, Jiang X. VEGFR2 inhibition by RNA interference affects cell proliferation, migration, invasion, and response to radiation in Calu-1 cells // Clinical and Translational Oncology. – 2016. – Т. 18. – №. 2. – С. 212-219.
18. Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Laviña B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nyström S, Rymo S, Chen LL, Pang MF. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2 // Developmental cell. – 2012. – Т. 23. – №. 3. – С. 587-599.
19. Mellberg S, Dimberg A, Bahram F, Hayashi M, Rennel E, Ameer A, Westholm JO, Larsson E, Lindahl P, Cross MJ, Claesson-Welsh L. Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis // The FASEB Journal. – 2009. – Т. 23. – №. 5. – С. 1490-1502.
20. Jang DH, Song DH, Chang EJ, Jeon JY. Anti-inflammatory and lymphangiogenic effects of low-level laser therapy on lymphedema in an experimental mouse tail model // Lasers in medical science. – 2016. – Т. 31. – №. 2. – С. 289-296.
21. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo // Genes & development. – 1994. – Т. 8. – №. 16. – С. 1897-1909.
22. Cobbaut M, Derua R, Döppler H, Lou HJ, Vandoninck S, Storz P, Turk BE, Seufferlein T, Waelkens E, Janssens V, Van Lint J. Differential regulation of PKD isoforms in oxidative stress conditions through phosphorylation of a conserved Tyr in the P+ 1 loop // Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 887.
23. Kunze K, Spieker T, Gamerdinger U, Nau K, Berger J, Dreyer T, Sindermann JR, Hoffmeier A, Gattenlöhner S, Bräuning A. A recurrent activating PLCG1 mutation in cardiac angiosarcomas increases apoptosis resistance and invasiveness of endothelial cells // Cancer research. – 2014. – С. canres. 1162.2014.
24. Behjati S. et al. Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma // Nature genetics. – 2014. – Т. 46. – №. 4. – С. 376.
25. Ogilvie P, Paoletti S, Clark-Lewis I, Ugucioni M. Eotaxin-3 is a natural antagonist for CCR2 and exerts a repulsive effect on human monocytes // Blood. – 2003. – Т. 102. – №. 3. – С. 789-794.
26. Kuna P, Reddigari SR, Rucinski D, Oppenheim JJ, Kaplan AP. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for human basophils // Journal of Experimental Medicine. – 1992. – Т. 175. – №. 2. – С. 489-493.
27. Ruiz-García R, Mora S, Lozano-Sánchez G, Martínez-Lostao L, Paz-Artal E, Ruiz-Contreras J, Anel A, González-Granado LI, Moreno D, Allende LM. Decreased activation-induced cell death by EBV-transformed B cells from a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a novel FASLG mutation // Pediatric research. – 2015. – Т. 78. – №. 6.
28. Ye Y, Vattai A, Zhang X, Zhu J, Thaler CJ, Mahner S, Jeschke U, von Schönfeldt V. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in pathologies of female reproductive diseases // International journal of molecular sciences. – 2017. – Т. 18. – №. 8. – С. 1651.
29. Chen R, Yan J, Liu P, Wang Z, Wang C. Plasminogen activator inhibitor links obesity and thrombotic cerebrovascular diseases: The roles of PAI-1 and obesity on stroke // Metabolic brain disease. – 2017. – Т. 32. – №. 3. – С. 667-673.

ENDOTHELIAL APOPTOSIS GENES AS CANDIDATES FOR THE STUDY OF THEIR ASSOCIATIONS WITH LYMPHEDEMA

O.V. Saik¹, *junior researcher*

V.V. Nimaev², *doctor of medical sciences, head of laboratory*

D.B. Usmonov³, *medical resident*

P.S. Demenkov¹, *candidate of technical sciences, researcher*

I.N. Lavrik^{1,4}, *candidate of biological sciences, professor, head of laboratory*

V.A. Ivanisenko¹, *candidate of biological sciences, associate professor, head of laboratory*

¹ **Federal research center of the institute of cytology and genetics of the SB RAS**

² **Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology – Branch of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS**

³ **Tsiv'yan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics**

⁴ **Otto von Guericke Magdeburg university**

¹**(Russia, Novosibirsk)**

²**(Russia, Novosibirsk)**

³**(Russia, Novosibirsk)**

⁴**(Germany, Magdeburg)**

***Abstract.** Currently, more than 150 million people in the world are suffering from lymphedema. This disease is characterized by high-protein edema of various parts of the body, caused by impaired lymphatic drainage. The molecular genetic basis of the pathogenesis of lymphedema is currently not fully understood. Disorders of endothelial apoptosis are among the factors involved in the development of lymphedema. In this paper, using the ToppGene program, we performed a search among genes involved in endothelial apoptosis to find perspective candidates for genotyping aimed on revealing of associations with lymphedema. KDR, TEK, MAP3K5, ABL1, PLCG1, CCL2, FASLG, DAB2IP, ICAM1 and SERPINE1 were identified as the highest priority genes.*

***Keywords:** endothelial apoptosis, lymphedema, gene prioritization, ToppGene, candidates for genotyping.*