

# Молекулярно-генетические механизмы взаимодействия процессов ответа клетки на механический стресс и нейронального апоптоза при первичной открытоугольной глаукоме

О.В. Сайк<sup>1</sup>, Н.А. Коновалова<sup>2</sup>, П.С. Деменков<sup>1</sup>, Н.В. Иванисенко<sup>1,3</sup>, Т.В. Иванисенко<sup>1</sup>, Д.Е. Иванощук<sup>1</sup>,  
О.С. Коновалова<sup>2</sup>, О.А. Подколотная<sup>1</sup>, И.Н. Лаврик<sup>1,4</sup>, Н.А. Колчанов<sup>1</sup>, В.А. Иванисенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Тюмень, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> Магдебургский университет имени Отто фон Гуерике, Магдебург, Германия

Глаукома – хроническое, прогрессирующее заболевание, которым страдают более 60 млн человек в мире. Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) занимает одно из первых мест по распространенности среди различных форм глаукомы. Например, в 2011 г. эта форма заболевания наблюдалась более чем у 2.7 млн человек в США. В настоящее время ПОУГ является основной причиной необратимой потери зрения. У больных с открытоугольной глаукомой риск слепоты достигает 27 %, даже несмотря на проводимое лечение. Известно, что гибель клеток зрительного нерва может быть спровоцирована механическим стрессом, вызванным повышенным внутриглазным давлением, наблюдающимся при ПОУГ, индуцирующим нейрональный апоптоз. В настоящее время существует огромное количество научных публикаций, описывающих белки и гены, которые участвуют в патогенезе ПОУГ, в том числе в нейрональном апоптозе и клеточном ответе на механический стресс. Тем не менее молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе патофизиологии ПОУГ, до сих пор плохо изучены. Реконструкция ассоциативных генных сетей, описывающих функциональные взаимодействия между этими генами/белками, включая биохимические реакции, регуляторные взаимодействия, события транспорта и т. д., требует использования методов автоматизированного извлечения знаний из текстов научных публикаций. В работе проанализированы ассоциативные сети, описывающие молекулярно-генетические взаимодействия между белками и генами, вовлеченными в ответ клетки на механический стресс (ОКМС), нейрональный апоптоз и патогенез ПОУГ. Показано, что гены, ассоциированные с ПОУГ, статистически значимо чаще, чем ожидалось по случайным причинам, представлены среди генов, участвующих во взаимодействии между ОКМС и нейрональным апоптозом, что может быть важным фактором, влияющим на гибель ганглиозных ретинальных клеток при ПОУГ.

Ключевые слова: апоптоз; нейрональный апоптоз; ответ клетки на механический стресс; первичная открытоугольная глаукома; ПОУГ; ANDSystem; ассоциативные генные сети.

## Molecular-genetic mechanisms of the interaction between processes of cell response to mechanical stress and neuronal apoptosis in primary open-angle glaucoma

O.V. Saik<sup>1</sup>, N.A. Konovalova<sup>2</sup>,  
P.S. Demenkov<sup>1</sup>, N.V. Ivanisenko<sup>1,3</sup>,  
T.V. Ivanisenko<sup>1</sup>, D.E. Ivanoshchuk<sup>1</sup>,  
O.S. Konovalova<sup>2</sup>, O.A. Podkolodnaya<sup>1</sup>,  
I.N. Lavrik<sup>1,4</sup>, N.A. Kolchanov<sup>1</sup>, V.A. Ivanisenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia

<sup>3</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Institute of Experimental Internal Medicine, Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

Glaucoma is a chronic and progressive disease, which affects more than 60 million people worldwide. Primary open-angle glaucoma (POAG) is one of the most common forms of glaucoma. For example, about 2.71 million people in the USA had primary open-angle glaucoma in 2011. Currently POAG is a major cause of irreversible vision loss. In patients with treated open-angle glaucoma the risk of blindness reached to be about 27 %. It is known that the death of optic nerve cells can be triggered by mechanical stress caused by increased intraocular pressure, which induces neuronal apoptosis and is observed in patients with POAG. Currently, there is a large number of scientific publications describing proteins and genes involved in the pathogenesis of POAG, including neuronal apoptosis and the cell response to mechanical stress. However, the molecular-genetic mechanisms underlying the pathophysiology of POAG are still poorly understood. Reconstruction of associative networks describing the functional interactions between these genes/proteins, including biochemical reactions, regulatory interactions, transport, etc., requires the use of methods of automated knowledge

extraction from texts of scientific publications. The aim of the work was the analysis of associative networks, describing the molecular-genetic interactions between proteins and genes involved in cell response to mechanical stress (CRMS), neuronal apoptosis and pathogenesis of POAG using ANDSystem, our previous development for automated text analysis. It was shown that genes associated with POAG are statistically significantly more often represented among the genes involved in the interactions between CRMS and neuronal apoptosis than it was expected by random reasons, which can be an explanation for the effect of POAG leading to the retinal ganglion cell death.

**Key words:** apoptosis; neuronal apoptosis; cell response to mechanical stress; primary open-angle glaucoma; POAG; ANDSystem; associative gene networks.

**КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:**

Сайк О.В., Коновалова Н.А., Демеников П.С., Иванисенко Н.В., Иванисенко Т.В., Иваношук Д.Е., Коновалова О.С., Подколотная О.А., Лаврик И.Н., Колчанов Н.А., Иванисенко В.А. Молекулярно-генетические механизмы взаимодействия процессов ответа клетки на механический стресс и нейронального апоптоза при первичной открытоугольной глаукоме. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(6):840-847. DOI 10.18699/VJ16.200

**HOW TO CITE THIS ARTICLE:**

Saik O.V., Konovalova N.A., Demenkov P.S., Ivanisenko N.V., Ivanisenko T.V., Ivanoshchuk D.E., Konovalova O.S., Podkolodnaya O.A., Lavrik I.N., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. Molecular-genetic mechanisms of the interaction between processes of cell response to mechanical stress and neuronal apoptosis in primary open-angle glaucoma. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(6):840-847. DOI 10.18699/VJ16.200

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – одна из наиболее часто встречающихся форм глаукомы, характеризующаяся прогрессирующей гибелью ганглионарных клеток сетчатки. Гибель клеток зрительного нерва сопровождается характерным сужением полей зрения с последующей необратимой потерей зрения. Механизм гибели ганглионарных клеток до сих пор в деталях не изучен, однако предполагается, что ключевая роль в этом процессе принадлежит апоптозу (Wang et al., 2013). Апоптоз, или запрограммированная клеточная гибель, играет важную роль в различных генетико-физиологических процессах, в том числе в процессах обновления клеток, развития и функционирования иммунной системы, а также эмбрионального развития (Kerr et al., 1972). Считается, что существуют два основных пути апоптоза: индуцируемый через рецепторы клеточной смерти и митохондриальный. Нарушения функционирования как митохондриального пути, так и пути индукции апоптоза через рецепторы, являются важным молекулярно-генетическим механизмом развития многих заболеваний, таких как нейродегенеративные заболевания, ишемические повреждения, аутоиммунные расстройства, различные виды рака и др. (Elmore, 2007). В большинстве случаев ПОУГ характеризуется повышением внутриглазного давления, в результате которого ганглиозные клетки сетчатки испытывают постоянный механический стресс. В настоящее время полагают, что ответ клетки на механический стресс (ОКМС), наряду с оксидативным стрессом и опосредованной гиперактивацией глутаматных рецепторов, может быть основным фактором, индуцирующим нейрональный апоптоз при глаукоме (Calandrella et al., 2007). Однако повышенное внутриглазное давление хотя и является одним из наиболее важных факторов риска развития глаукомы, не всегда приводит к ней (Matsopoulos et al., 2008). Современные методы лечения глаукомы направлены на

снижение внутриглазного давления, в том числе посредством оперативного или лазерного вмешательства и лекарственного воздействия, но, к сожалению, не позволяют полностью остановить патологический процесс и могут только замедлить потерю функции глаза (Quigley, 1999, 2011; Almasieh et al., 2012; Jindal, 2013). Можно предположить, что нарушение функции генов, ассоциированных с глаукомой, оказывает влияние на взаимодействие между процессами ОКМС и нейронального апоптоза.

Цель работы – анализ ассоциативных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между белками и генами, ассоциированными с ПОУГ, а также участвующими в процессах ОКМС и нейрональном апоптозе. Выявление генов, вовлеченных в такие взаимодействия, может быть основой для разработки лекарственных препаратов, корректирующих молекулярно-генетические нарушения, вызывающие повышенный апоптоз ганглионарных клеток сетчатки при ПОУГ.

## Материалы и методы

Выявление генов, ассоциированных с ПОУГ (согласно литературным данным), а также реконструкция ассоциативных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между этими генами и белками, и генами, участвующими в процессах ОКМС и нейронального апоптоза, осуществлялись с использованием системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015). Эта система была разработана для автоматического анализа научных публикаций с целью извлечения знаний о молекулярно-генетических взаимодействиях и ассоциациях белков, генов, метаболитов, лекарств, микроРНК с заболеваниями, биологическими процессами, побочными эффектами лекарств и фенотипическими признаками различных организмов. ANDSystem была построена на основе широкомасштабного анализа более 25 млн аннотаций

научных статей, представленных в базе данных PubMed. Кроме того, в базу знаний интегрирована информация о молекулярно-генетических взаимодействиях из фактографических баз данных, таких как IntAct, MINT и др. Всего в базе знаний ANDSystem представлено более 7 млн фактов о молекулярно-генетических взаимодействиях и ассоциациях. Дополнительно для выявления генов, ассоциированных с ПОУГ, использовалась информация из баз данных OMIM (<http://www.omim.org/>), ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), GWAS Catalog (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) и SNPedia (<http://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>), полученная по запросу «Primary open angle glaucoma». Списки генов, вовлеченных в нейрональный апоптоз (GO:0051402) и ОКМС (GO:0071260), взяты из базы данных Gene Ontology annotation (<http://geneontology.org/>).

Для оценки статистической значимости сверхпредставленности набора генов в анализируемой выборке с помощью гипергеометрического распределения использовалась программа, доступная по адресу: <https://www.geneprof.org/GeneProf/tools/hypergeometric.jsp>.

Анализ сверхпредставленности Gene Ontology биологических процессов, а также выявление генов, экспрессирующихся в мозге, проводились веб-сервисом DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov>), все настройки использовались по умолчанию.

## Результаты и обсуждение

Использование системы ANDSystem позволило выявить 68 генов, ассоциированных с ПОУГ, согласно литературным данным. Среди этого набора для 35 генов приводились данные о наличии полиморфизмов, ассоциированных с ПОУГ. Остальные гены авторы статей ассоциировали с ПОУГ на основе изменения их функции или экспрессии при данном заболевании. С помощью анализа баз данных OMIM, ClinVar, GWAS Catalog и SNPedia дополнительно были выявлены 12, 2, 10 и 9 генов соответственно. Списки генов, вовлеченных в ОКМС и нейрональный апоптоз, содержали 80 и 213 генов соответственно. Оказалось, что среди 213 генов, участвующих в нейрональном апоптозе, представлены 10 генов (*HIF1A*, *CTNNA1*, *FAS*, *GSK3B*, *FADD*, *HDAC4*, *MAP2K4*, *BNIP3*, *CASP2*, *HDAC7*), вовлеченные также в ОКМС. Известно, например, что экспрессия гена *HIF1A* увеличивается при механическом стрессе (Fu-lan et al., 2012), в свою очередь повышенная экспрессия гена *HIF1A* приводит к активации апоптоза (Park et al., 2014). В работе (Dorn, Kirshenbaum, 2008) показано, что при механическом стрессе, вызванном сдавливанием, активируется транскрипция гена *BNIP3*. Кроме того, известно, что подавление активности *BNIP3* оказывает протективное действие по отношению к апоптозу предшественников нервных клеток (Wang et al., 2013). Анализ сверхпредставленности показал, что эти 10 генов статистически значимо сверхпредставлены среди генов, участвующих в нейрональном апоптозе ( $p$ -value <  $10^{-7}$ ).

Механический стресс может оказывать также влияние на функцию генов апоптоза путем прямых межмолекулярных взаимодействий. С помощью системы ANDSystem было реконструировано 506 взаимодействий между белками, вовлеченными в ответ клетки на механический стресс,

и белками, участвующими в нейрональном апоптозе. Рассматривались такие типы взаимодействий, как регуляция активности, регуляция деградации, регуляция экспрессии, белок-белок взаимодействия и регуляция транспорта. Наибольшее число связей (410) наблюдалось для белок-белок взаимодействий. Интересно, что число взаимодействий типа «expression upregulation» примерно в четыре раза превышало число взаимодействий типа «expression downregulation» и составило 15 и 4 связи соответственно. В качестве примера положительной регуляции экспрессии можно привести белок *GSK3b* и ген *Bim*. Известно, что подавление активности белка *GSK3b*, наблюдающееся при ОКМС (Badorff et al., 2002), активирует экспрессию гена *Bim* (McCubrey et al., 2014), вовлеченного в активацию нейронального апоптоза (Zhao et al., 2016). Кроме того, оказалось, что белки, вовлеченные в ОКМС, способны регулировать деградацию белков нейронального апоптоза по типу связи «degradation downregulation». Например, белок *JNK1*, который активируется под влиянием механического стресса (Zhou et al., 2007), способен увеличивать стабильность белка *P73* (Ozaki et al., 2010), являющегося в нейронах проапоптотическим белком (Klein et al., 2011). Из выявленных взаимодействий видно, что регуляция белков и генов нейронального апоптоза со стороны ответа клетки на механический стресс может быть направлена на активацию процесса апоптоза посредством положительной регуляции экспрессии генов и стабильности белков, вовлеченных в нейрональный апоптоз, что согласуется с известными данными (Calandrella et al., 2007; Slemmer et al., 2008; Uchida et al., 2008). Также следует отметить, что из 213 генов/белков, участвующих в нейрональном апоптозе, 118 были вовлечены во взаимодействие с белками ОКМС, что существенно превышало значение данной величины, ожидаемое по случайным причинам. Согласно гипергеометрическому распределению, перепредставленность участников взаимодействий с белками ОКМС среди генов/белков нейронального апоптоза имела статистическую значимость ( $p$ -value <  $10^{-40}$ ).

Хорошо известно, что на функцию белка или гена, являющихся представителями какой-либо генной сети, существенное влияние могут оказывать другие участники генной сети посредством прямых взаимодействий, а также путем передачи сигнала по цепочкам вершин сети, имеющих между собой соответствующие связи. В настоящей работе с помощью инструмента Pathway Wizard системы ANDSystem были реконструированы все возможные цепочки длиной 3 вершины, описывающие опосредованные связи между белками ОКМС и белками/генами нейронального апоптоза. Pathway Wizard позволяет проводить поиск цепочек в глобальной ассоциативной сети ANDSystem по заданному шаблону. Для поиска регуляторных цепочек, связывающих ОКМС и нейрональный апоптоз, шаблон задавался следующим образом: 1) первым участником цепочки может быть только белок или ген ОКМС; 2) вторым участником может быть любой белок или ген, вовлеченный в нейрональный апоптоз; 3) третьим участником может быть только белок или ген, вовлеченный в нейрональный апоптоз; 4) тип связей между первым и вторым, а также между вторым и третьим участниками цепочки может быть любой из числа: регуляция активности, регуляция деградации, регуля-

ция экспрессии, белок-белок взаимодействия и регуляция транспорта; 5) направление связи должно быть от первого участника ко второму, а также от второго к третьему (для связей белок-белок взаимодействий направление не рассматривалось). Всего получено более 5000 цепочек, связывающих, согласно заданным требованиям, 79 генов/белков, вовлеченных в ОКМС, и 188 генов/белков, участвующих в нейрональном апоптозе. Число генов/белков – посредников таких взаимодействий – составило 2064.

В найденных цепочках взаимодействий наибольшее число связей (9457) было представлено белок-белок взаимодействиями. Отметим, что число связей типа «activity upregulation» превышало число связей «activity downregulation» и составило 244 и 213 соответственно. Число связей «degradation downregulation» примерно в два раза превышало число связей «degradation upregulation» – 101 и 45 соответственно. Число связей типа «expression upregulation» превышало число связей типа «expression downregulation» и составило 144 и 106 связей соответственно. Этот результат говорит в пользу того, что механический стресс может оказывать активирующее влияние на функцию генов апоптоза даже путем не прямых межмолекулярных взаимодействий через ген/белок-посредник. По данным аннотации системой DAVID, среди 2064 генов/белков-посредников были выявлены 1939 генов/белков, которые экспрессируются в тканях мозга. Эти гены/белки вовлечены в 277 сверхпредставленных Gene Ontology биологических процессов, в том числе во врожденный иммунный ответ (GO:0045087), трансдукцию сигнала, опосредованную малой ГТФазой (GO:0007264), регуляцию процесса апоптоза (GO:0042981) и др.

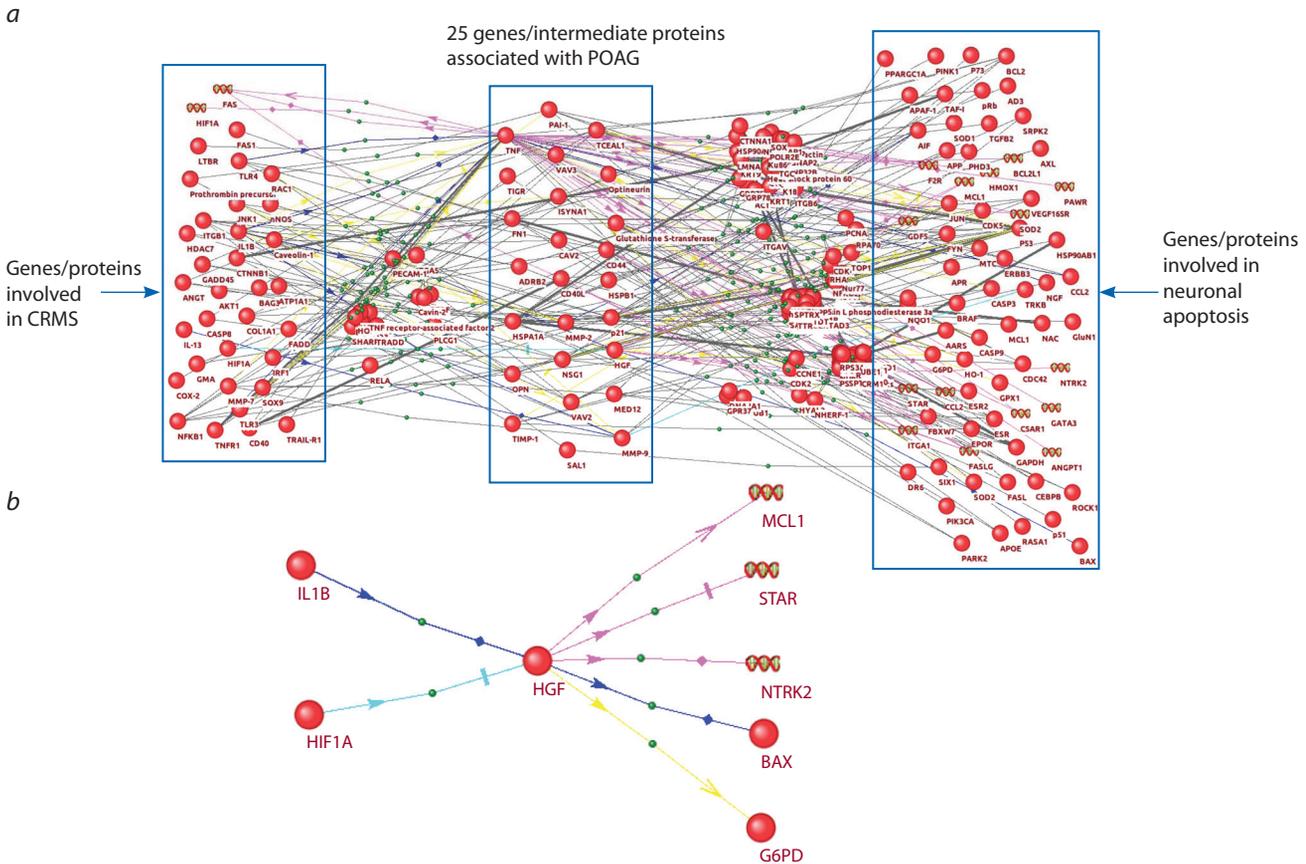
Следующим шагом нашего анализа было исследование возможного влияния генов, ассоциированных с ПОУГ, на взаимодействия между ОКМС и нейрональным апоптозом. Мы предполагали, что если среди генов, обеспечивающих такое взаимодействие, согласно реконструкции ассоциативных сетей, будут статистически значимо перепредставлены гены, ассоциированные с ПОУГ, то нарушение регуляции нейронального апоптоза со стороны ОКМС, вызванное нарушениями функции или экспрессии этих генов, может быть одним из важных молекулярных механизмов патогенеза ПОУГ.

Всего нами выявлено 96 генов, вовлеченных в патогенез ПОУГ, в том числе 68 генов, ассоциированных с ПОУГ согласно данным ANDSsystem, а также 37 генов, информация об ассоциации которых с ПОУГ была извлечена из баз данных. Среди них для 63 генов имелась информация о полиморфизмах, а для 33 генов указывалось изменение их экспрессии при ПОУГ. Выяснилось, что среди 80 генов, вовлеченных в ОКМС, были представлены 3 гена (*IL1B*, *TLR4* и *CAVI*), ассоциированных с ПОУГ. Несмотря на то что это число относительно небольшое, гены, ассоциированные с ПОУГ, согласно гипергеометрическому распределению были статистически значимо перепредставлены ( $p$ -value < 0,008). Известно, например, что при ПОУГ, вызванной мутациями в гене *MYOC*, наблюдается значительное повышение экспрессии гена *IL1B* (Itakura et al., 2015). Также показано, что механический стресс сопровождается повышенной экспрессией гена *IL1B* (Glossop, Cartmell, 2009). Для гена *TLR4* показано, что

его экспрессия активируется при механическом стрессе (Gawri et al., 2014). Интересно отметить, что генотип (A/A) полиморфизма rs4986790 в этом гене может иметь протективный эффект против ПОУГ (Abu-Amero et al., 2016), а ряд других полиморфизмов (rs10759930, rs1927914, rs1927911, rs2149356), возможно, имеет значение для патогенеза ПОУГ (Takano et al., 2012). В работе (Sun et al., 2003) сообщается о транслокации кавеолина-1 (продукта гена *CAVI*) на клеточной поверхности при ответе на механический стресс, а также о повышении концентрации кавеолина-1 внутри клетки. Также для гена *CAVI* известны мутации (rs4236601 и rs3801994), ассоциированные с ПОУГ (Rong et al., 2016). По-видимому, нарушения структуры кавеолина-1, вызванные мутациями, препятствуют адекватному ответу клетки на механический стресс, что может иметь значение для патогенеза ПОУГ.

В свою очередь анализ взаимоотношения между ПОУГ и нейрональным апоптозом показал статистически значимое пересечение между списками генов, вовлеченных в нейрональный апоптоз, и генов, ассоциированных с ПОУГ. Среди 213 генов, участвующих в нейрональном апоптозе, было представлено 9 ассоциированных с ПОУГ генов, в том числе *TP53*, *APOE*, *BDNF*, *ESR2*, *SOD2*, *TGFB2*, *NRP1*, *SIX1* и *NTF4*. Данное число генов превышало ожидаемое по случайным причинам, а статистическая значимость их перепредставленности составила  $p$ -value <  $10^{-7}$ . Для 6 из этих 9 генов (*TP53*, *APOE*, *BDNF*, *ESR2*, *SOD2*, *TGFB2*) были найдены прямые межмолекулярные взаимодействия с генами/белками, вовлеченными в ОКМС. То есть большинство ассоциированных с ПОУГ генов, участвующих в нейрональном апоптозе, оказались генами, составляющими потенциальный интерфейс для взаимодействия между ОКМС и нейрональным апоптозом. Примером такого взаимодействия является увеличение активности белка *SOD2*, участвующего в нейрональном апоптозе и ассоциированного с ПОУГ, под действием белка *IL1B*, вовлеченного в ОКМС. Известно, что у мышей с нокаутом гена *SOD2* наблюдается индукция нейронального апоптоза (Maity-Kumar et al., 2015), а повышение экспрессии гена *SOD2* приводит к снижению нейронального апоптоза (Jung et al., 2010). В работе (Borg et al., 1992) говорится об увеличении активности *SOD2* под влиянием *IL1B*. Кроме того, при механическом стрессе наблюдается значительное повышение экспрессии гена *IL1B* (Glossop, Cartmell, 2009). Взаимосвязь между *IL1B* и *SOD2* может отражать потенциальный механизм адаптации клеток сетчатки к механическому стрессу. В то же время известно, что у пациентов с ПОУГ наблюдаются мутации в гене *SOD2* (Lascaratos et al., 2012; Zhou et al., 2015). По-видимому, такие мутации могут нарушать механизмы адаптации клеток сетчатки к механическому стрессу и приводить к повышенному нейрональному апоптозу, наблюдаемому при ПОУГ.

Дальнейший анализ генов-посредников, обеспечивающих потенциальные взаимодействия между ОКМС и нейрональным апоптозом через молекулярно-генетические цепочки, включающие трех участников, тоже показал статистически значимую перепредставленность среди них генов, ассоциированных с ПОУГ. Так, оказалось, что среди 1939 генов/белков-посредников, экспрессиру-



The associative network describing putative interactions between neuronal apoptosis and CRMS through molecular genetic chains, reconstructed using Pathway Wizard of ANDSystem. (a) The total network including 25 genes/intermediate proteins associated with POAG. (b) An example of chains passing through the hepatocyte growth factor (HGF), which acts as an intermediary associated with POAG.

щихся в тканях мозга, 25 генов/белков были ассоциированы с ПОУГ, что превышало ожидаемое по случайным причинам количество ( $p$ -value  $< 10^{-5}$ ). На рисунке (a) показана ассоциативная сеть, включающая все цепочки, проходящие через данные 25 генов/белков-посредников. В качестве примера отдельно взятой цепочки приведена сеть взаимодействий фактора роста гепатоцитов (HGF), выступающего в роли посредника (см. рисунок, б).

Известно, что интерлейкин-1 $\beta$  (IL1B), который вовлечен в ОКМС, активирует секрецию белка HGF, ассоциированного с ПОУГ (Baroni et al., 1998; Paduch et al., 2010). Другой белок, индуцируемый гипоксией фактор-1 $\alpha$  (HIF1A) и также участвующий в ОКМС, способен повышать стабильность HGF (Chu et al., 2009). В свою очередь HGF оказался связанным с двумя белками и тремя генами, ассоциированными с нейрональным апоптозом (см. рисунок, б). Согласно данным работ (Au et al., 2009; Lu et al., 2015), HGF активирует экспрессию генов, кодирующих рецептор 2 типа нейротрофической тирозинкиназы (NTRK2) и белок Mcl1. Экспрессия другого гена стероидогенного острого регуляторного белка (STAR), вовлеченного в нейрональный апоптоз, отрицательно регулируется HGF (Taniguchi et al., 2004). HGF также задействован в регуляции активности белка G6PD (Shao et

al., 1996) и транслокации белка Bax (Nakagami et al., 2002), участвующих в нейрональном апоптозе.

Согласно анализу перепредставленности Gene Ontology биологических процессов, 25 генов/белков-посредников статистически значимо были вовлечены в 12 процессов (см. таблицу).

Среди этих процессов можно выделить такие, как организация внеклеточного матрикса (GO:0030198 и GO:0022617), регуляция продукции интерлейкина-8 (GO:0032757), Eph-рецепторный сигнальный путь (GO:0048013) и регуляция апоптоза (GO:0043066 и GO:2001240). Например, в процессе отрицательной регуляции пути апоптоза, индуцируемого через рецепторы клеточной смерти, в отсутствие лиганда (GO:2001240) участвовали три гена (*TNF*, *HSPA1A*, *HSPA1B*), а в процессе Eph-рецепторного сигнального пути (GO:0048013), который играет важную роль в аксональном наведении (Egea, Klein, 2007), долговременной потенциации (Kullander, Klein, 2002) и канцерогенезе (Genander, Frisén, 2010), – четыре гена (*MMP9*, *MMP2*, *VAV2*, *VAV3*).

**Заключение**

Анализ ассоциативных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между белками и гена-

Biologic processes overrepresented in Gene Ontology for the set of 25 intermediate genes expressed in brain tissues associated with POAG

Gene Ontology: biologic process	Genes	p-value with Benjamini correction
GO:0030198 ~ extracellular matrix organization	<i>TNF, MMP9, MMP2, SERPINE1, CD44, SPP1, FN1, TIMP1</i>	10 <sup>-3</sup>
GO:0030168 ~ platelet activation	<i>SERPINE1, HGF, FN1, CD40LG, TIMP1, VAV2, VAV3</i>	10 <sup>-3</sup>
GO:0022617 ~ extracellular matrix disassembly	<i>MMP9, MMP2, CD44, SPP1, FN1, TIMP1</i>	10 <sup>-3</sup>
GO:0032757 ~ upregulation of interleukin-8 production	<i>TNF, SERPINE1, HSPA1A, HSPA1B</i>	10 <sup>-3</sup>
GO:0007596 ~ blood coagulation	<i>SERPINE1, CD44, HGF, FN1, TIMP1, VAV2, VAV3</i>	0.01
GO:0002576 ~ platelet degranulation	<i>SERPINE1, HGF, FN1, TIMP1</i>	0.02
GO:0001525 ~ angiogenesis	<i>MMP2, SERPINE1, FN1, VAV2, VAV3</i>	0.02
GO:0010628 ~ upregulation of gene expression	<i>TNF, CD44, FN1, HSPA1A, HSPA1B</i>	0.02
GO:0048013 ~ ephrin receptor signaling pathway	<i>MMP9, MMP2, VAV2, VAV3</i>	0.02
GO:0043066 ~ negative regulation of the apoptotic process	<i>MMP9, CDKN1A, CD44, FN1, CD40LG, TIMP1</i>	0.03
GO:0035987 ~ endodermal cell differentiation	<i>MMP9, MMP2, FN1</i>	0.03
GO:2001240 ~ negative regulation of the extrinsic apoptotic signaling pathway with the absence of the ligand	<i>TNF, HSPA1A, HSPA1B</i>	0.04

ми, вовлеченными в ответ клетки на механический стресс (GO:0071260) и нейрональный апоптоз (GO:0051402), показал, что эти процессы тесно связаны между собой, а их участники имеют статистически значимое пересечение с генами, ассоциированными с ПОУГ. При этом было обнаружено, что гены, ассоциированные с ПОУГ, представлены в большем количестве, чем ожидалось по случайным причинам, среди генов, участвующих в прямых и непрямых взаимодействиях ОКМС/нейрональный апоптоз. Среди генов, ассоциированных с ПОУГ, составляющих потенциальный интерфейс для прямых взаимодействий ОКМС/нейрональный апоптоз, были выявлены гены *TP53, APOE, BDNF, ESR2, SOD2, TGFβ2*. В непрямых взаимодействиях ОКМС/нейрональный апоптоз могут участвовать 25 генов-посредников, включая *TNF, MMP2, MMP9, HGF, MYOC, VAV2, VAV3* и др.

Таким образом, можно предположить, что нарушения во взаимодействиях между ОКМС и нейрональным апоптозом, вызванные нарушением функцией генов, ассоциированных с ПОУГ, играют важную роль в патогенезе заболевания. Результаты анализа могут быть использованы для поиска новых лекарственных мишеней для терапии первичной открытоугольной глаукомы.

### Acknowledgments

The filling of the ANDSystem database for associations of genes with POAG through text mining and the reconstruction of POAG associative networks were supported by the Russian Science Foundation program «Computational systems biology: analysis and modeling of network structure—functional organization and evolution», project 14-24-00123.

The reconstruction and analysis of associative networks describing the interaction between CRMS and neuronal ap-

optosis were supported by the Russian Science Foundation program «Programmed cell death induced via death receptors: identification of molecular mechanisms underlying apoptosis by molecular simulation», project 14-44-00011.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Abu-Amero K.K., Kondkar A.A., Mousa A., Azad T.A., Sultan T., Osman E.A., Al-Obeidan S.A. Analysis of toll-like receptor rs4986790 polymorphism in Saudi patients with primary open angle glaucoma. *Ophthalmic Genetics*. 2016;1-5. DOI 10.3109/13816810.2016.1151900.
- Almasieh M., Wilson A.M., Morquette B., Vargas J.L., Di Polo A. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Progress in Retinal Eye Research*. 2012;31(2):152-181. DOI 10.1016/j.preteyeres.2011.11.002.
- Au C.W., Siu M.K., Liao X., Wong E.S., Ngan H.Y., Tam K.F., Chan D.C., Chan Q.K., Cheung A.N. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers – effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome. *Cancer Letters*. 2009;281(2):151-161. DOI 10.1016/j.canlet.2009.02.025.
- Badorff C., Ruetten H., Mueller S., Stahmer M., Gehring D., Jung F., Ihling C., Zeiher A.M., Dimmeler S. Fas receptor signaling inhibits glycogen synthase kinase 3β and induces cardiac hypertrophy following pressure overload. *J. Clin. Investigation*. 2002;109(3):373-381. DOI 10.1172/JCI13779.
- Baroni A., Perfetto B., Ruocco E., Rossano F. Lipoteichoic acid and protein-A from *Staphylococcus aureus* stimulate release of hepatocyte growth factor (HGF) by human dermal fibroblasts. *Archives Dermatol. Research*. 1998;290(4):211-214.
- Borg L.A., Cagliero E.N., Sandler S.T., Welsh N., Eizirik D.L. Interleukin-1 beta increases the activity of superoxide dismutase in rat pan-

- cretic islets. *Endocrinology*. 1992;130(5):2851-2857. DOI 10.1210/endo.130.5.1533363.
- Calandrella N., Scarsella G., Pescosolido N., Risuleo G. Degenerative and apoptotic events at retinal and optic nerve level after experimental induction of ocular hypertension. *Mol. Cell. Biochemistry*. 2007; 301(1-2):155-163. DOI 10.1007/s11010-006-9407-0.
- Chu S.H., Feng D.F., Ma Y.B., Zhu Z.A., Zhang H., Qiu J.H. Stabilization of hepatocyte growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Biol. Reports*. 2009;36(7):1967-1975. DOI 10.1007/s11033-008-9406-1.
- Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biology*. 2012;11(3, 4):149-161. DOI 10.3233/ISB-2012-0449.
- Dorn G.W., Kirshenbaum L.A. Cardiac reanimation: targeting cardiomyocyte death by BNIP3 and NIX/BNIP3L. *Oncogene*. 2008;27: 158-167. DOI 10.1038/onc.2009.53.
- Egea J., Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends in Cell Biology*. 2007;17(5):230-238. DOI 10.1016/j.tcb.2007.03.004.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*. 2007;35(4):495-516. DOI 10.1080/01926230701320337.
- Fu-lan W.E., Jie G.E., Chun-ling W.A., Hui W.A., Ben-jun Z.H., Fan Z.H. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in human dental pulp cells under mechanical stretch. *Shanghai J. Stomatol.* 2012;21(5).
- Gawri R., Rosenzweig D.H., Krock E., Ouellet J.A., Stone L.S., Quinn T.M., Haglund L. High mechanical strain of primary intervertebral disc cells promotes secretion of inflammatory factors associated with disc degeneration and pain. *Arthritis Research Therapy*. 2014;16(1):1. DOI 10.1186/ar4449.
- Genander M., Frisén J. Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Current Opinion Cell Biology*. 2010;22(5):611-616. DOI 10.1016/j.ccb.2010.08.005.
- Glossop J.R., Cartmell S.H. Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cells: differential gene expression of IL1B and MAP3K8 in MAPK signaling. *Gene Expression Patterns*. 2009;9(5):381-388. DOI 10.1016/j.gep.2009.01.001.
- Itakura T., Peters D.M., Fini M.E. Glaucomatous MYOC mutations activate the IL-1/NF- $\kappa$ B inflammatory stress response and the glaucoma marker SELE in trabecular meshwork cells. *Mol. Vision*. 2015; 21:1071.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Systems Biology*. 2015;9(2):1. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Jindal V. Glaucoma: an extension of various chronic neurodegenerative disorders. *Mol. Neurobiology*. 2013;48(1):186-189. DOI 10.1007/s12035-013-8416-8.
- Jung J.E., Kim G.S., Chen H., Maier C.M., Narasimhan P., Song Y.S., Niizuma K., Katsu M., Okami N., Yoshioka H., Sakata H. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol. Neurobiology*. 2010;41(2-3):172-179. DOI 10.1007/s12035-010-8102-z.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*. 1972;26(4):239.
- Klein A., Maldonado C., Vargas L.M., Gonzalez M., Robledo F., de Arce K.P., Muñoz F.J., Hetz C., Alvarez A.R., Zanlungo S. Oxidative stress activates the c-Abl/p73 proapoptotic pathway in Niemann-Pick type C neurons. *Neurobiol. Disease*. 2011;41(1):209-18. DOI 10.1016/j.nbd.2010.09.008.
- Kullander K., Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nature Rev. Mol. Cell Biology*. 2002;3(7):475-486. DOI 10.1038/nrm856.
- Lascaratos G., Garway-Heath D.F., Willoughby C.E., Chau K.Y., Schapira A.H. Mitochondrial dysfunction in glaucoma: understanding genetic influences. *Mitochondrion*. 2012;12(2):202-212. DOI 10.1016/j.mito.2011.11.004.
- Lu S., Török H.P., Gallmeier E., Kolligs F.T., Rizzani A., Arena S., Göke B., Gerbes A.L., De Toni E.N. Tivantinib (ARQ 197) affects the apoptotic and proliferative machinery downstream of c-MET: role of Mcl-1, Bcl-xl and Cyclin B1. *Oncotarget*. 2015;6(26):22167. DOI 10.18632/oncotarget.4240.
- Maity-Kumar G., Thal D.R., Baumann B., Scharffetter-Kochanek K., Wirth T. Neuronal redox imbalance results in altered energy homeostasis and early postnatal lethality. *FASEB J*. 2015;29(7):2843-2858. DOI 10.1096/fj.14-265157.
- Matsopoulos G.K., Asvestas P.A., Delibasis K.K., Mouravliansky N.A., Zeyen T.G. Detection of glaucomatous change based on vessel shape analysis. *Comput. Med. Imaging Graphics*. 2008;32(3):183-192. DOI 10.1016/j.compmedimag.2007.11.003.
- McCubrey J.A., Steelman L.S., Bertrand F.E., Davis N.M., Sokolosky M., Abrams S.L., Montalto G., D'Assoro A.B., Libra M., Nicoletti F., Maestro R. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014;5(10):2881-2911. DOI 10.18632/oncotarget.2037.
- Nakagami H., Morishita R., Yamamoto K., Taniyama Y., Aoki M., Yamasaki K., Matsumoto K., Nakamura T., Kaneda Y., Ogihara T. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes*. 2002;51(8):2604-2611.
- Ozaki T., Kubo N., Nakagawara A. p73-binding partners and their functional significance. *Intern. J. Proteomics*. 2010. DOI 10.1155/2010/283863.
- Paduch R., Gil J.J., Niedziela P. Hepatocyte growth factor (HGF), heat shock proteins (HSPs) and multidrug resistance protein (MRP) expression in co-culture of colon tumor spheroids with normal cells after incubation with interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and/or camptothecin (CPT-11). *Indian J. Exp. Biol*. 2010;48(4):354-364.
- Park J., Park S.Y., Shin E., Lee S.H., Kim Y.S., Lee D.H., Roh G.S., Kim H.J., Kang S.S., Cho G.J., Jeong B.Y. Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  directly regulates nuclear clusterin transcription by interacting with hypoxia response elements in the clusterin promoter. *Mol. Cells*. 2014;37(2):178-186. DOI 10.14348/molcells.2014.2349.
- Quigley H.A. Neuronal death in glaucoma. *Progress Retinal Eye Res*. 1999;18(1):39-57.
- Quigley H.A. Glaucoma. *Lancet*. 2011;377(9774):1367-1377. DOI 10.1016/S0140-6736(10)61423-7.
- Rong S.S., Chen L.J., Leung C.K., Matsushita K., Jia L., Miki A., Chiang S.W., Tam P.O., Hashida N., Young A.L., Tsujikawa M. Ethnic specific association of the *CAVI1/CAI2* locus with primary open-angle glaucoma. *Sci. Rep*. 2016;6:27837. DOI 10.1038/srep27837.
- Shao Q., Arakaki N., Ohnishi T., Nakamura O., Daikuhara Y. Effect of hepatocyte growth factor/scatter factor on lipogenesis in adult rat hepatocytes in primary culture. *J. Biochemistry*. 1996;119(5): 940-946.
- Slemmer J.E., Zhu C., Landshamer S., Trabold R., Grohm J., Ardeshiri A., Wagner E., Sweeney M.I., Blomgren K., Culmsee C., Weber J.T. Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury. *Am. J. Pathol*. 2008;173(6): 1795-1805. DOI 10.2353/ajpath.2008.080168.
- Sun R.J., Muller S., Zhuang F.Y., Stoltz J.F., Wang X. Caveolin-1 redistribution in human endothelial cells induced by laminar flow and cytokine. *Biorheology*. 2003;40(1,2,3):31-39.
- Takano Y., Shi D., Shimizu A., Funayama T., Mashima Y., Yasuda N., Fukuchi T., Abe H., Ideta H., Zheng X., Shiraishi A. Association of Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in Japanese subjects with primary open-angle, normal-tension, and exfoliation glaucoma. *Am. J. Ophthalmology*. 2012;154(5):825-832. DOI 10.1016/j.ajo.2012.03.050.
- Taniguchi F., Harada T., Deura I., Iwabe T., Tsukihara S., Terakawa N. Hepatocyte growth factor promotes cell proliferation and inhibits progesterone secretion via PKA and MAPK pathways

- in a human granulosa cell line. *Mol. Reproduction Development*. 2004;68(3):335-344. DOI 10.1002/mrd.20076.
- Uchida K., Nakajima H., Takamura T., Furukawa S., Kobayashi S., Yayama T., Baba H. Gene expression profiles of neurotrophic factors in rat cultured spinal cord cells under cyclic tensile stress. *Spine*. 2008;33(24):2596-2604. DOI 10.1097/BRS.0b013e31818917af.
- Wang F., Xiong L., Huang X., Zhao T., Wu L.Y., Liu Z.H., Ding X., Liu S., Wu Y., Zhao Y., Wu K. miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells. *Stem Cell Res*. 2013;11(1):657-667. DOI 10.1016/j.scr.2013.04.005.
- Zhao Y., Zhu L., Yu S., Zhu J., Wang C. CaMKII inhibition promotes neuronal apoptosis by transcriptionally upregulating Bim expression. *NeuroReport*. 2016;27(14):1018-1023. DOI 10.1097/WNR.0000000000000648.
- Zhou Y., Millward-Sadler S.J., Lin H., Robinson H., Goldring M., Salter D.M., Nuki G. Evidence for JNK-dependent up-regulation of proteoglycan synthesis and for activation of JNK1 following cyclical mechanical stimulation in a human chondrocyte culture model. *OsteoArthritis Cartilage*. 2007;15(8):884-893. DOI 10.1016/j.joca.2007.02.001.
- Zhou Y., Shuai P., Li X., Liu X., Wang J., Yang Y., Hao F., Lin H., Zhang D., Gong B. Association of *SOD2* polymorphisms with primary open angle glaucoma in a Chinese population. *Ophthalmic Genetics*. 2015;36(1):43-49. DOI 10.3109/13816810.2014.985844.