

# Реконструкция и анализ сети взаимодействий между генами, регулирующими массу тела человека

Подготовила Матросова Е.А.,  
студентка КИБ ФЕН НГУ, направление подготовки 06.03.01  
Научный руководитель Игнатьева Е.В.,  
к.б.н., с.н.с. лаб. эволюционной биоинформатики и теоретической  
генетики ИЦиГ СО РАН

Новосибирск, 2019 г.

# Ожирение

**Ожирение** – хроническое мультифакторное заболевание, проявляющееся в избыточном увеличении массы жировой ткани.

ГЕНЫ

Энергетический гомеостаз контролируется:

- Количество потребления пищи (пищевым поведением: анорексия, булемия);
- Эффективностью усвоения питательных веществ (ферментативная активность ЖКТ, кишечная микробиота);
- Физической активностью;
- Теплообменом (сократительный термогенез);
- Активностью эндокринных желез (тиреоидные гормоны, инсулин, глюкокортикоиды)
- ...

<p><b>Центральная нервная система</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушенное развитие мозга</li> <li>• Нарушения в лептин-меланокортиковом пути</li> <li>• Нарушенный энергетический гомеостаз</li> <li>• Нарушения нейронной передачи</li> <li>• Нарушенная регуляция аппетита</li> <li>• Изменения предпочтений в еде</li> </ul>	
<p><b>Печень</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушенный метаболизм липидов</li> <li>• ↑ Воспаление</li> </ul>	
<p><b>Поджелудочная железа</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Масса бета-клеток</li> <li>• ↑ Функционирование бета-клеток</li> </ul>	
<p><b>Жировая ткань</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ Лептин, ↑ или ↓ адипонектин</li> <li>• Нарушенный термогенез</li> <li>• Нарушенный гомеостаз адипоцитов</li> <li>• ↓ Переход белой жировой ткани в бурую</li> <li>• ↑ Воспаление</li> </ul>	
<p><b>Вкусовой рецептор</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушенная чувствительность жирным кислотам</li> </ul> <p><b>Слюнные железы</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушенный метаболизм амилазы и углеводов</li> </ul> <p><b>Желудок</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушенное переваривание лактозы</li> </ul> <p><b>Кишечная микробиота</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Нарушение соотношения популяций Bacteroidetes и Firmicutes</li> </ul> <p><b>Сопутствующие заболевания</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Сердечно-сосудистые заболевания</li> <li>• Сахарный диабет 2 типа</li> <li>• Психологические расстройства и др.</li> </ul>	

Физиология развития ожирения. **Красным** на рисунке отмечены причины развития ожирения, а **синим** – последствия.

Pigeyre M. et al. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. Clinical Science. 2016; 130, 943–986.

# Физиологические основы регуляции пищевого поведения

3



- Нейроны аркуатного ядра гипоталамуса (ARC), контролирующие пищевое поведение:
  - Орексигенные – стимулируют аппетит, вырабатывая и высвобождая NPY, AgRP и GABA.
  - Анорексигенные – подавляют аппетит, вырабатывая РОМС.
- Гормоны, подавляющие аппетит:
  - Лептин (LEP);
  - Инсулин (INS);
  - Холецистокинин;
  - РРГ<sub>3-36</sub>.
- Гормоны, стимулирующие аппетит:
  - Адипонектин;
  - Грелин.

# Генетические факторы развития ожирения

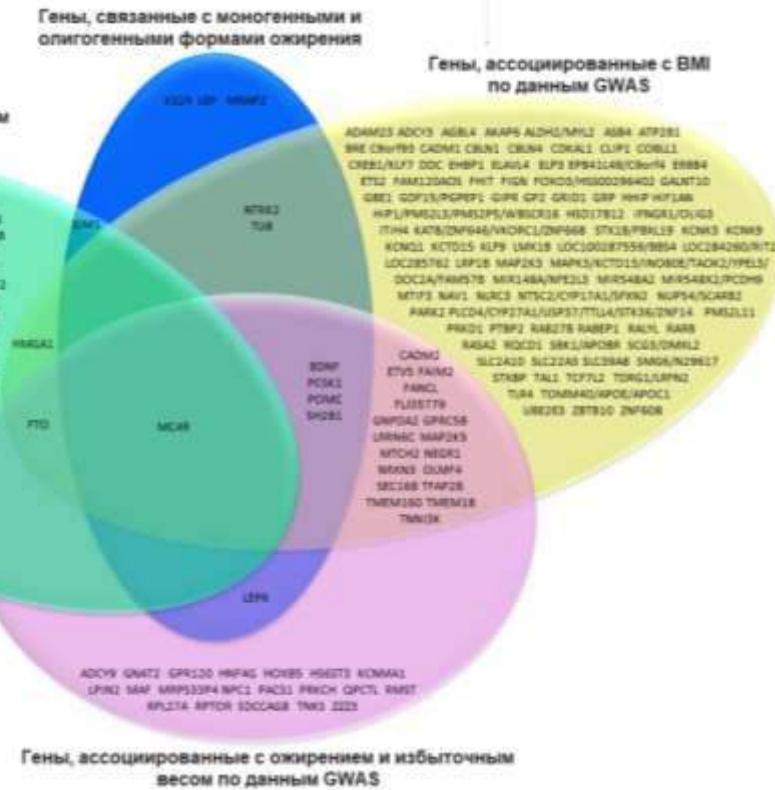
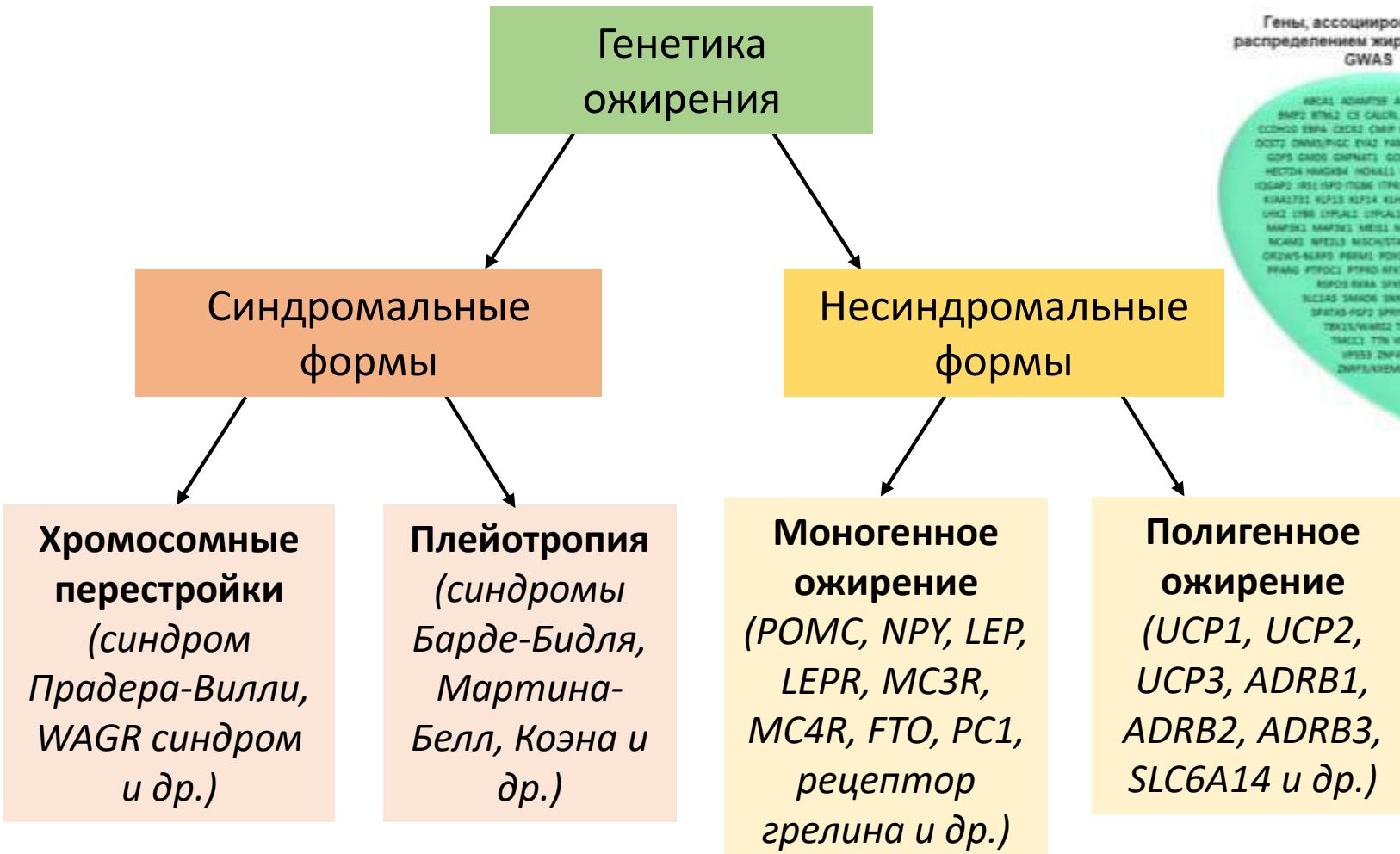
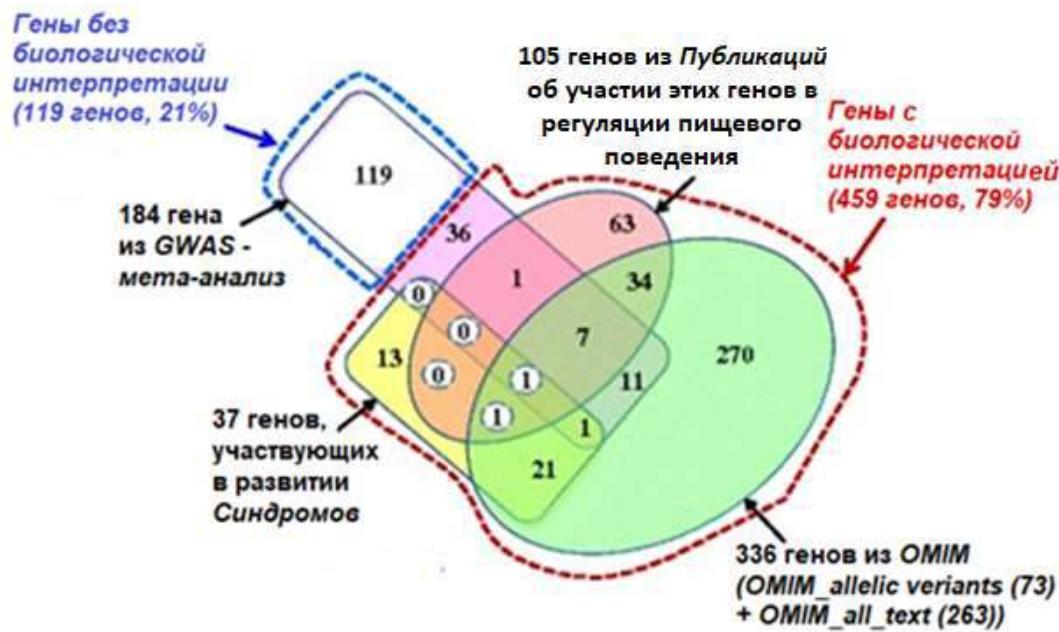


Диаграмма Венна, отображающая пересечение различных групп генов, участвующих в развитии ожирения.

# Цели и задачи работы

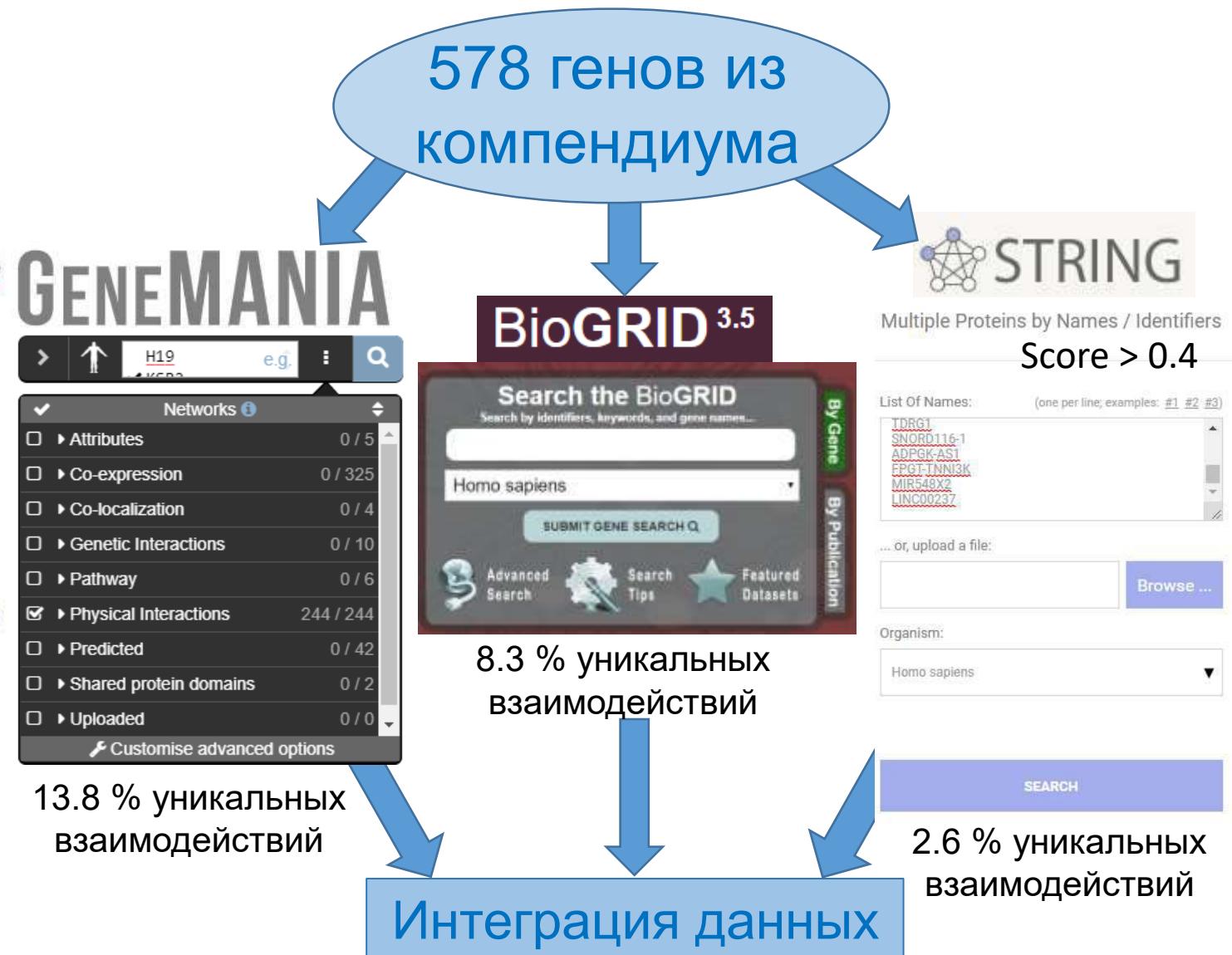
- **Цель:** построение и анализ сети взаимодействий между белками человека, контролирующими массу тела, и анализ потенциальных регуляторных эффектов SNP, ассоциированных с ожирением.
- **Задачи:**
  1. Экстракция из различных баз данных сведений о белок-белковых взаимодействиях между белковыми продуктами генов, участвующих в развитии ожирения у человека, и их интеграция.
  2. Реконструкция сетей белок-белковых взаимодействий между белками, кодируемыми всеми генами, участвующими в регуляции массы тела, и генами, экспрессирующимися в адипоцитах и клетках мозга.
  3. Выявление перепредставленных терминов молекулярных функций (GO анализ), которыми аннотированы белки из сетей (общей и специфичных для адипоцитов и клеток мозга), и сравнение наборов выявленных терминов.
  4. Анализ характеристик вершин сетей и выявление белков, занимающих ключевое положение в сетях.
  5. Анализ потенциального влияния полиморфизмов (SNP), выявленных в экспериментах GWAS, на функциональность сайтов связывания транскрипционных факторов в регуляторных районах генов, кодирующих белки общей сети.
  6. Выявление связей для белков, о которых нет данных о механизмах участия в регуляции массы тела, и построение гипотетических механизмов их участия.

# Поиск, экстракция и интеграция информации о белок-белковых взаимодействиях белков, кодируемых генами из компендиума



Структура компендиума генов, контролирующих пищевое поведение и массу тела.

Ignatieva E.V., Afonnikov D.A., Saik O.V., Rogaev E.I., Kolchanov N.A. A compendium of human genes regulating feeding behavior and body weight, its functional characterization and identification of GWAS genes involved in brain-specific PPI network. BMC Genet. 2016; 17(Suppl 3): 158.



# Реконструкция общей сети белок-белковых взаимодействий (сеть О)

Общий список белок-белковых взаимодействий



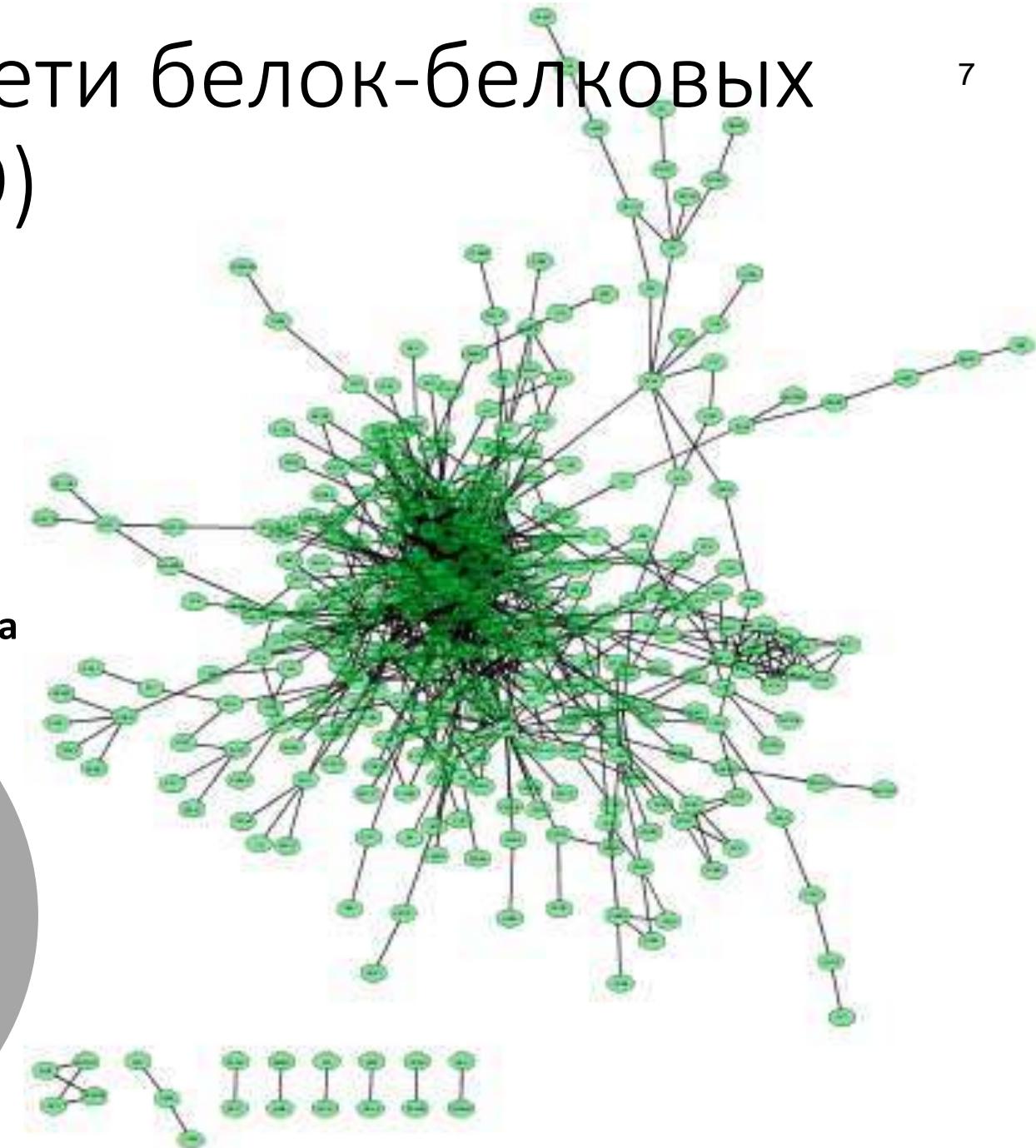
В сеть О вошли:

- 384 белка
- 888 связей

Вершины с наибольшим количеством связей:

- ESR1 (50 связей)
- CREBBP (31)
- STAT3 (31)
- SIRT1 (31)
- AR (30)

**578 генов из полного списка**

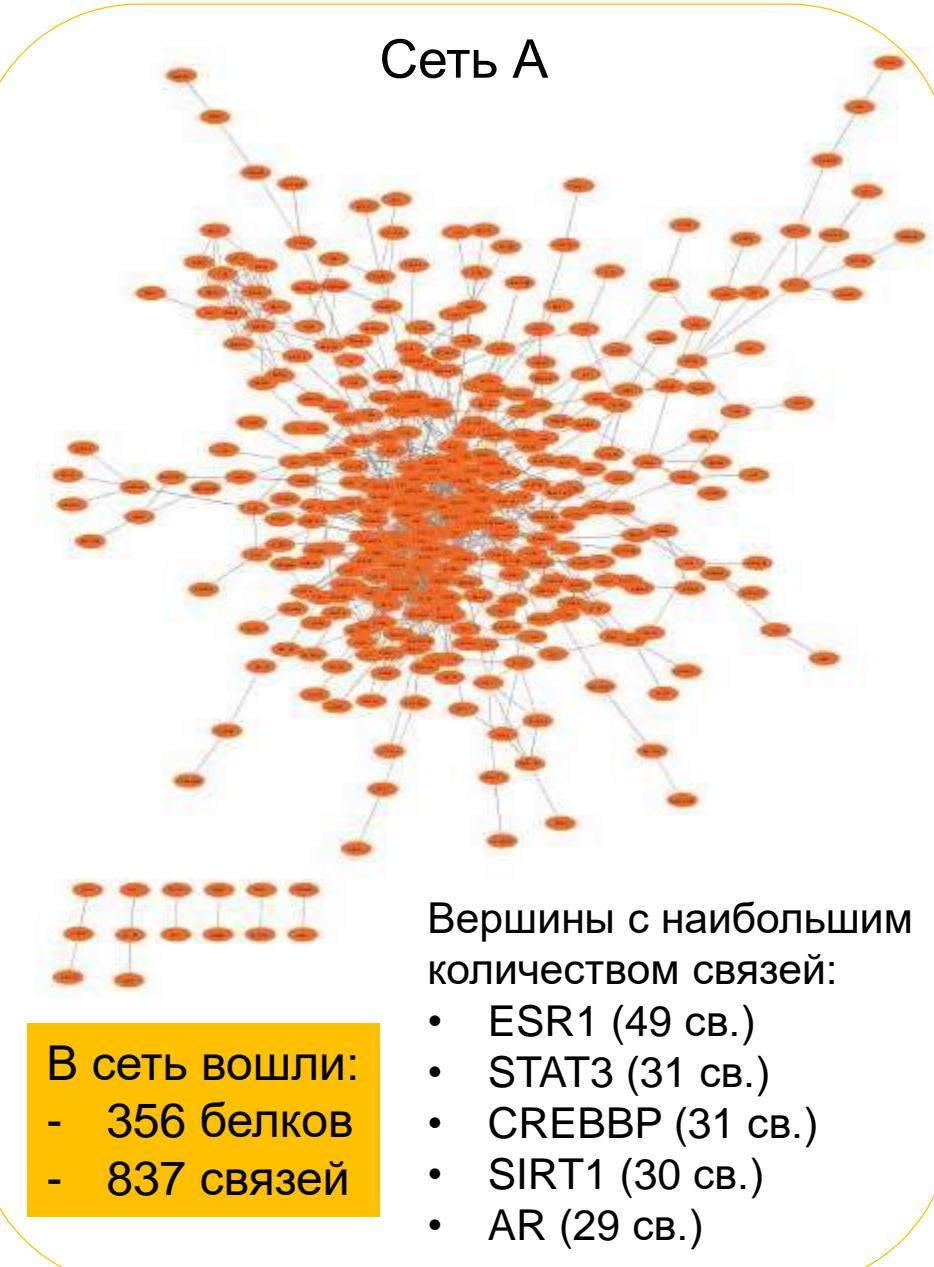


# Реконструкция сети, специфичной для адипоцитов (сеть А)

Данные по экспрессии генов в адипоцитах «subcutaneous adipose tissue», «human adult stage» (58853 генов) [база Вгее]



Фильтрация сети О с помощью Cytoscape на группы белков, кодируемыми генами, экспрессирующими и не экспрессирующими в жировой ткани по данным базы Вгее

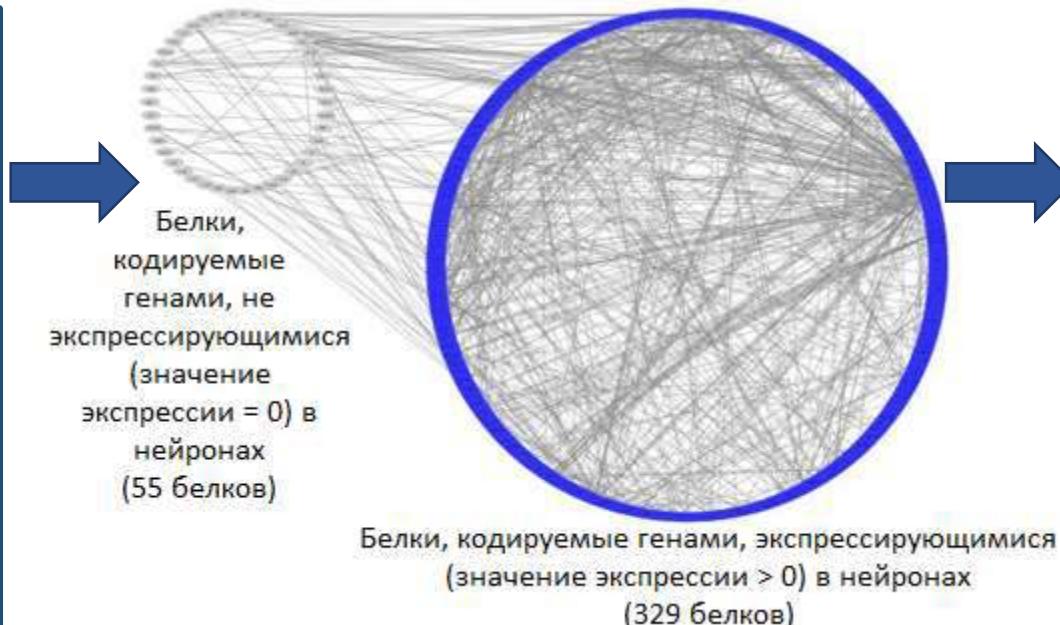


# Реконструкция сети, специфичной для клеток мозга (сеть В)

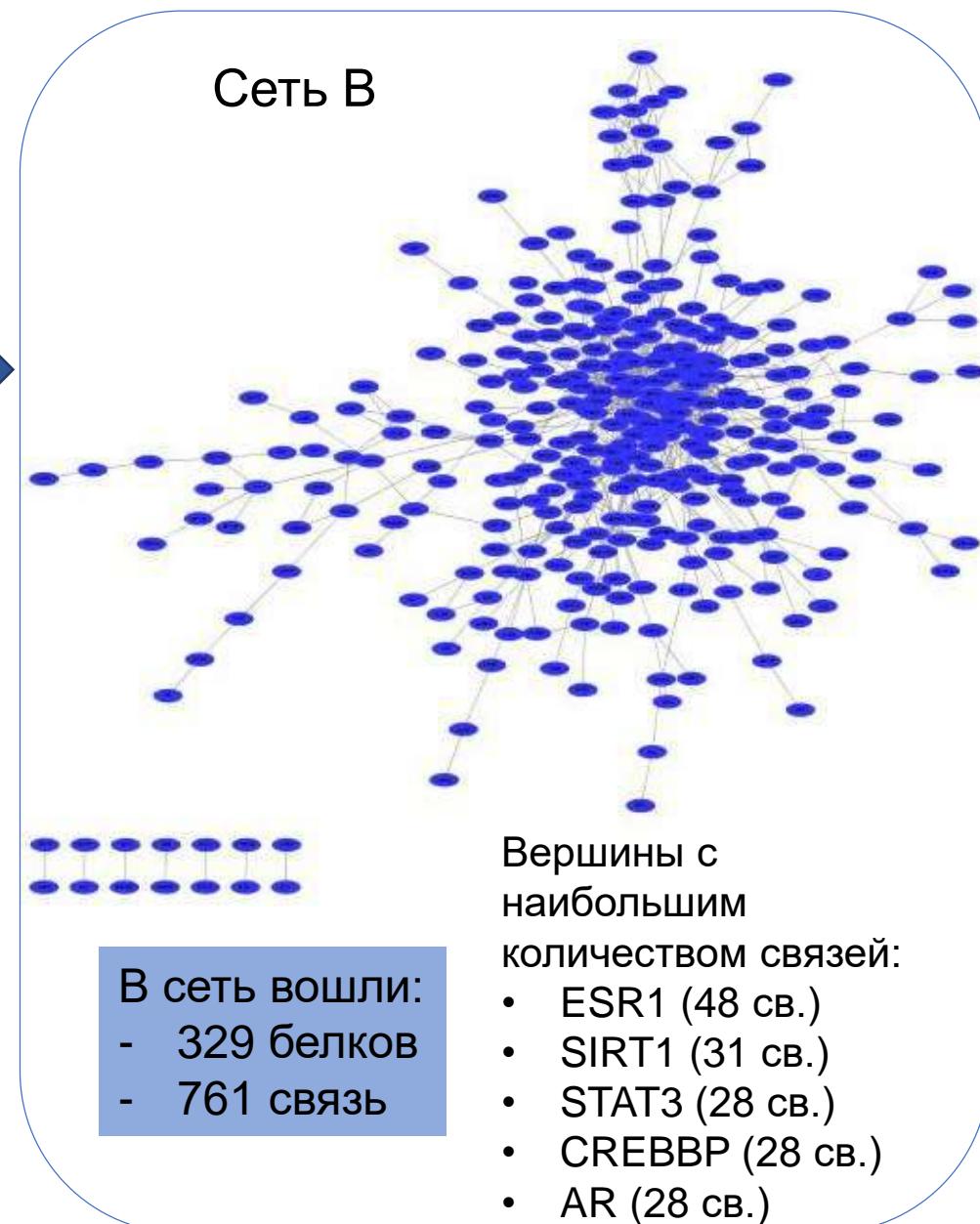
9

Данные по экспрессии генов в аркуатном ядре гипоталамуса – нейронах, экспрессирующих POMC и AgRP (35267 генов)

Henry F.E. et al. Cell type-specific transcriptomics of hypothalamic energy-sensing neuron responses to weight-loss. *Elife*. 2015.



Фильтрация сети О с помощью Cytoscape на группы белков, кодируемы генами, экспрессирующимися и не экспрессирующимися в нейронах



# Перепредставленные термины молекулярных функций (МФ), выявленные с помощью GO анализа



МФ, общие для списков О, А и В

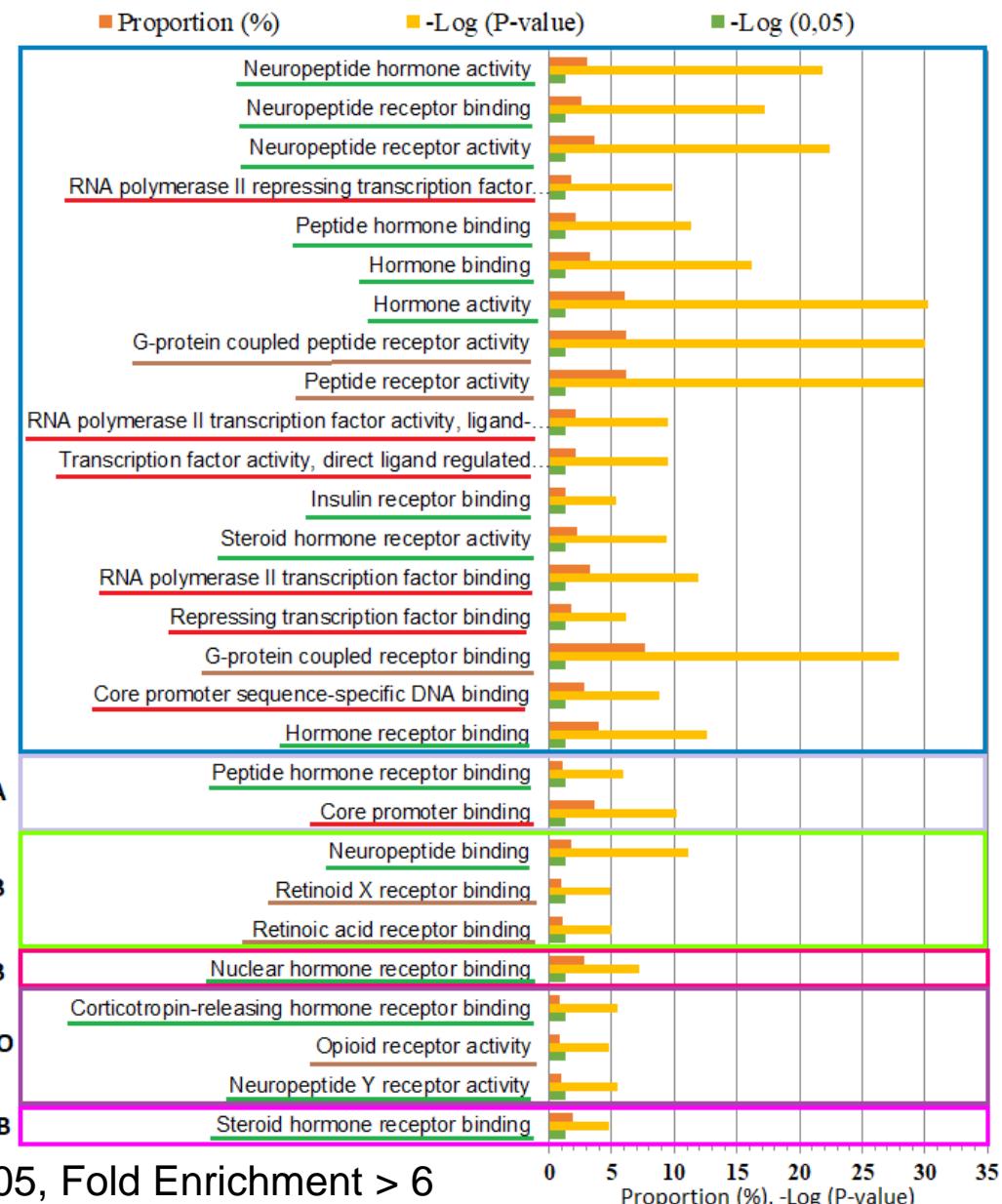
МФ, общие для списков О и А

МФ, общие для списков О и В

МФ, общие для списков А и В

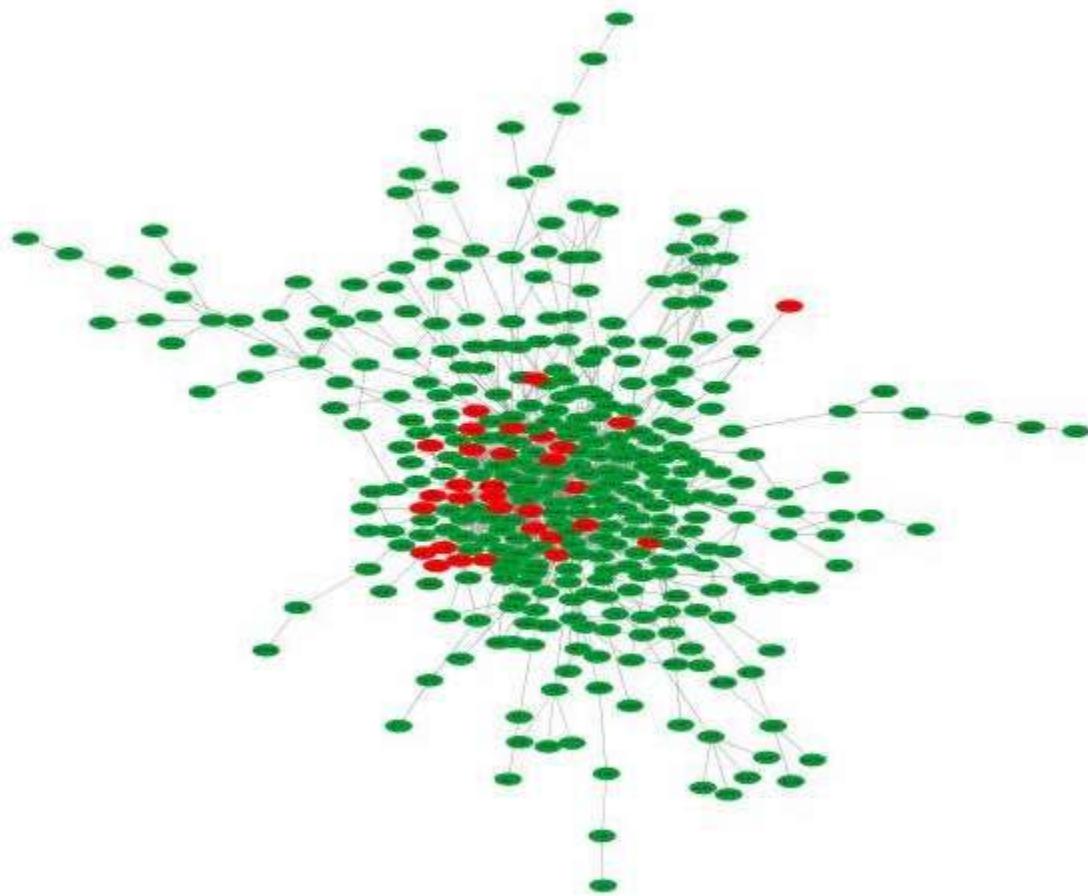
МФ, уникальные для списка О

МФ, уникальные для списка В



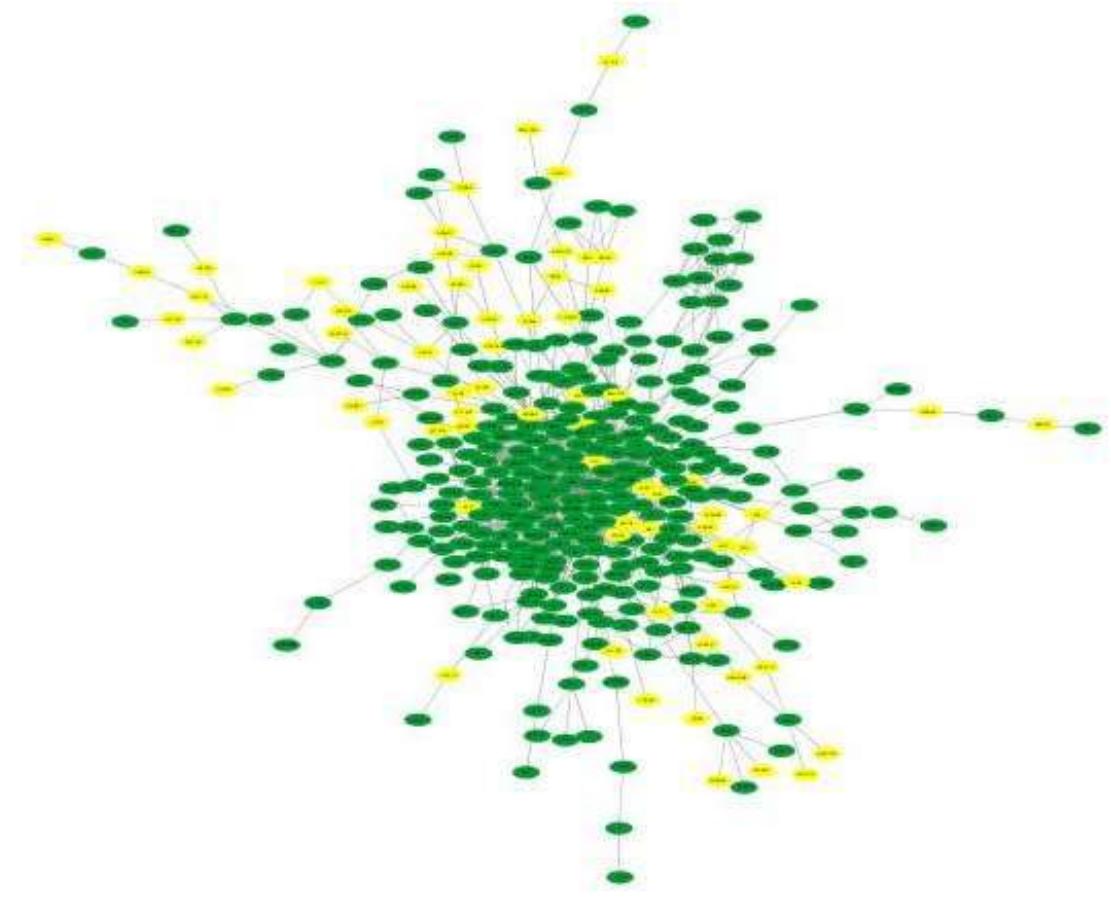
# Локализация регуляторов транскрипции и трансмембранных рецепторов в общей сети (сеть O)

11



Регуляторы транскрипции в основном подмножестве общей сети (отмечены красным)

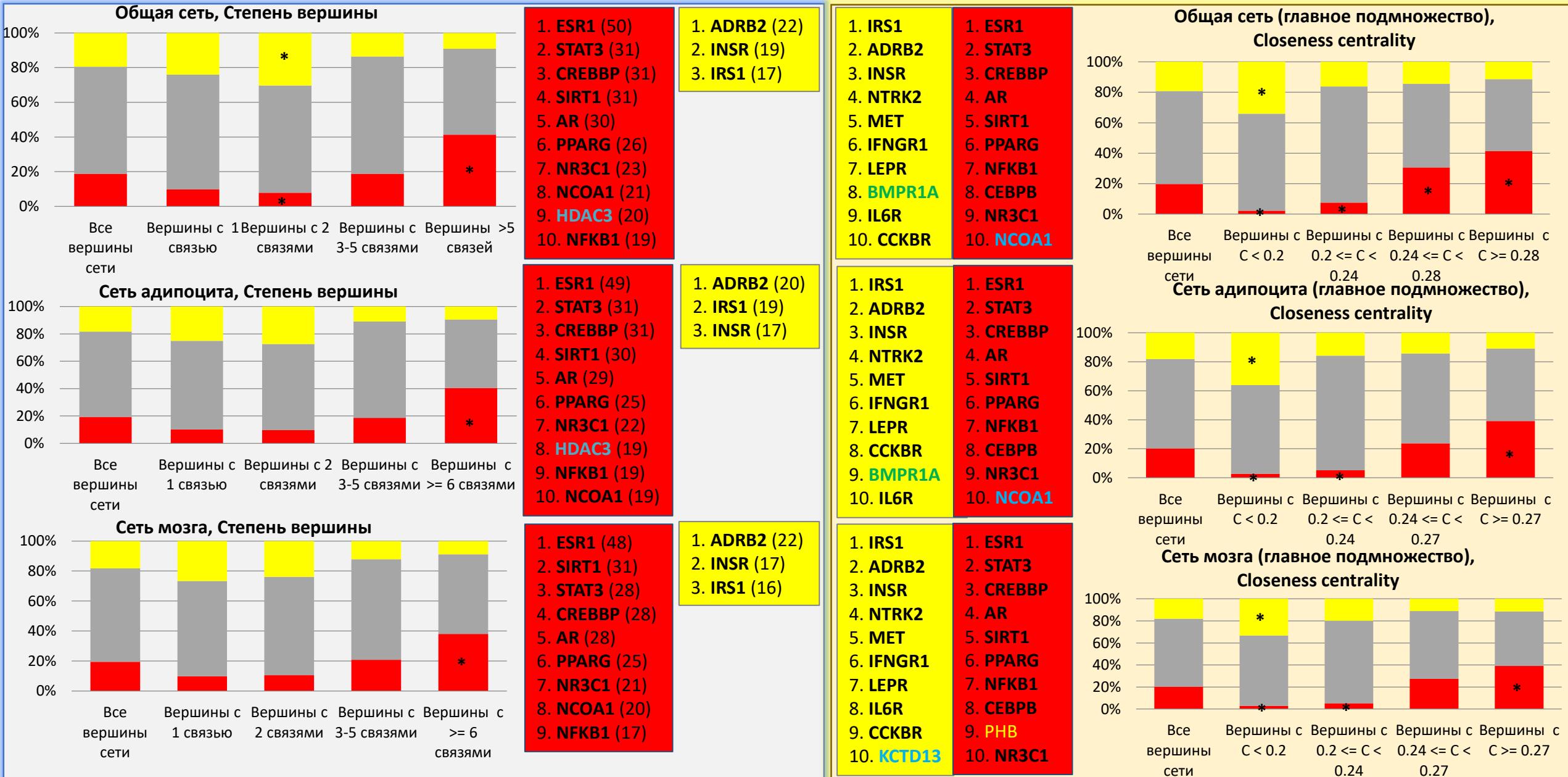
\*Регуляторы транскрипции = транскрипционные факторы + коактиваторы и корепрессоры + белки, модифицирующие хроматин.



Трансмембранные рецепторы в основном подмножестве общей сети (отмечены жёлтым)

# Анализ степени и центральности вершин сетей

12



# Основные этапы анализа потенциального влияния SNP на CCTФ в регуляторных районах генов

163 SNP, выявленных в экспериментах GWAS

[BMC Genet. 2016; 17(Suppl 3): 158]

**Определение позиции SNP относительно гена  
(программа UCSC Variant Annotation Integrator)**

32 SNP в 5'-фланкирующих районах генов

**Запрос к базе данных dbSNP**

32 последовательности ДНК, включающие SNP

**Предсказание CCTФ в районе локализации SNP  
(программа PERFECTOS-APE)**

638 CCTФ, на связывание которых с транскрипционными факторами  
могут повлиять нуклеотидные замены в районе локализации SNP

28 сайтов связывания для транскрипционных факторов, которые участвуют в  
общей сети белок-белковых взаимодействий (сети О)

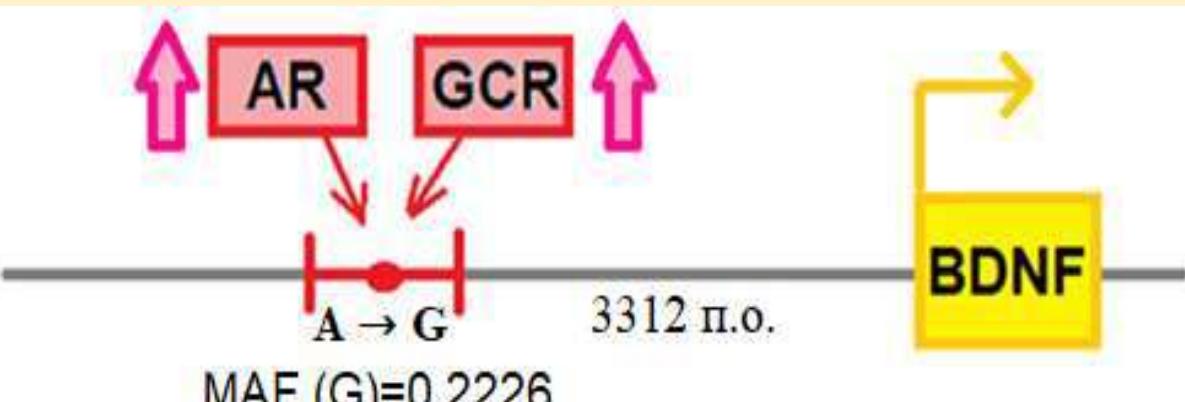
The screenshot shows the 'PerfectoS-APE' software interface. On the right, there is a configuration panel with the following settings:

- TFBS motif collection: НОСОМОСО-11 (human)
- Advanced options: [-]
- \* P-value cutoff: 0.01
- \* Fold change cutoff: 4.0

ССТФ, сродство которых к ТФ могло измениться в результате нуклеотидной замены в районе локализации SNP

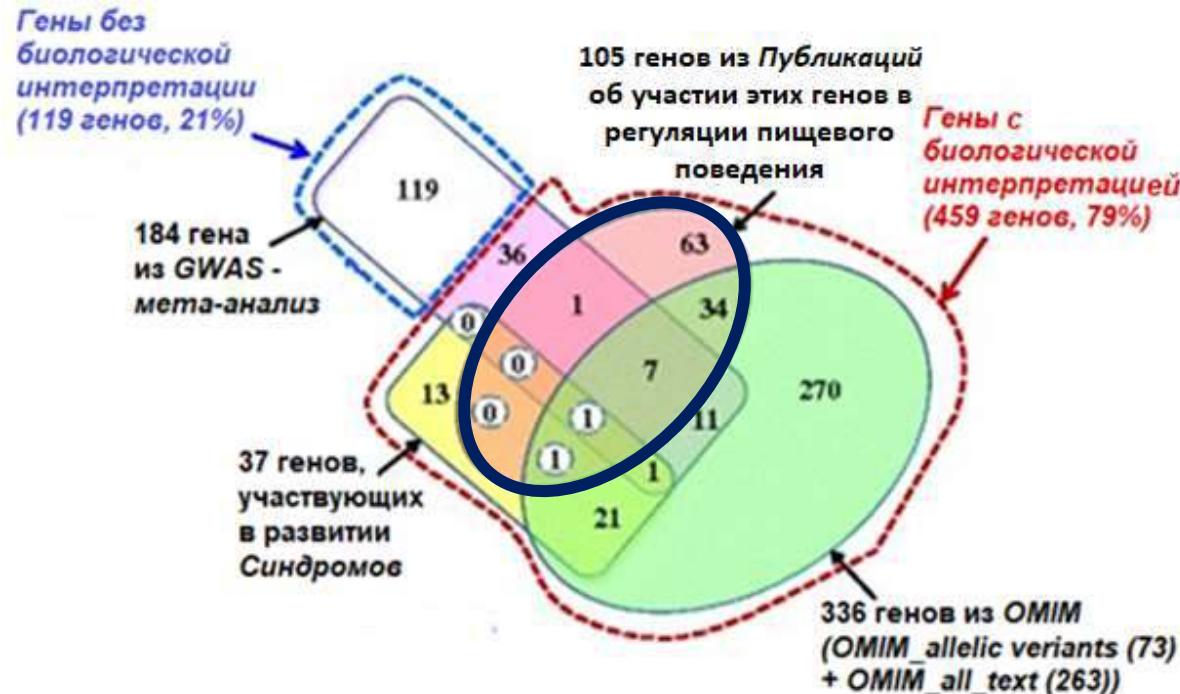
Предсказанные 28 ССТФ локализованы в регуляторных районах 13 генов, участвующих в регуляции массы тела.

Потенциальный механизм влияния SNP на сайты связывания транскрипционных факторов в регуляторном районе гена BDNF



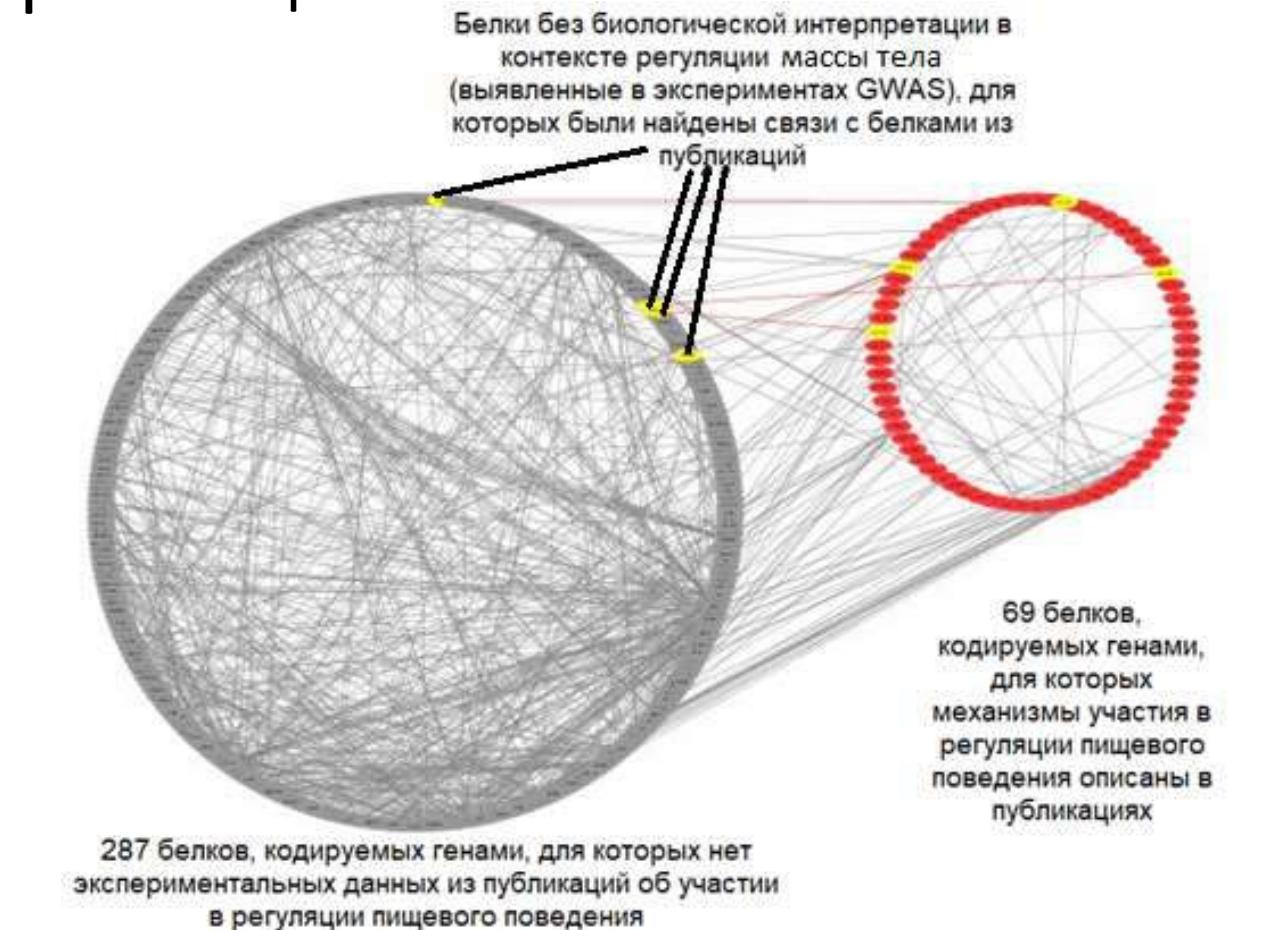
№	Название гена	Идентификатор полиморфизма	Название сайта связывания, который нарушился или появился в результате замены	Степень вершины ТФ в общей сети	Fold change (P-value 1/P-value 2)
1	BDNF	rs11030104	ANDR	30	4.2
2	BDNF	rs11030104	GCR	23	5.5
3	ATP2A1	rs3888190	SPI1	10	4.1
4	ATP2A1	rs3888190	STAT3	31	0.1
5	ATP2A1	rs3888190	ZF64A	1	0.1
6	AMPD2	rs17024393	NFKB1	19	4.9
7	AMPD2	rs17024393	TWST1	5	20.0
8	MTIF3	rs4771122	NR1D1	2	5.2
9	NLRC3	rs758747	KLF5	8	0.1
10	NLRC3	rs758747	ESR2	12	10.5
11	NLRC3	rs758747	ERR1	14	14.8
12	NLRC3	rs758747	THB	8	20.6
13	NLRC3	rs758747	PPARA	8	27.3
14	NLRC3	rs758747	ESR1	50	29.9
15	NLRC3	rs758747	RARB	5	51.1
16	TRIM66	rs4256980	PROX1	5	0.2
17	TRIM66	rs4256980	NFKB1	19	27.1
18	MTCH2	rs3817334	GATA3	7	13.5
19	MTCH2	rs3817334	FUBP1	4	0.02
20	HOXB6	rs9299	TF7L2	5	0.1
21	HOXB6	rs9299	FUBP1	4	24.9
22	HOXB6	rs9299	ANDR	30	28.9
23	ETV5	rs1516725	ANDR	30	6.6
24	ETV5	rs1516725	GCR	23	7.7
25	DMXL2	rs3736485	GATA2	6	0.2
26	NEGR1	rs3101336	GCR	23	0.2
27	POC5	rs2112347	SPI1	10	5.8
28	FRRS1L	rs6477694	ZF64A	1	0.1

# Выявление связей белков без биологической интерпретации



Структура компендиума генов, контролирующих пищевое поведение и массу тела.

Ignatieva E.V. et al., BMC Genetics 2016



Фильтрация сети A с помощью Cytoscape на группы белков, кодируемыми генами, для которых механизмы участия в регуляции пищевого поведения описаны в публикациях и, и генами, для которых таких данных нет.

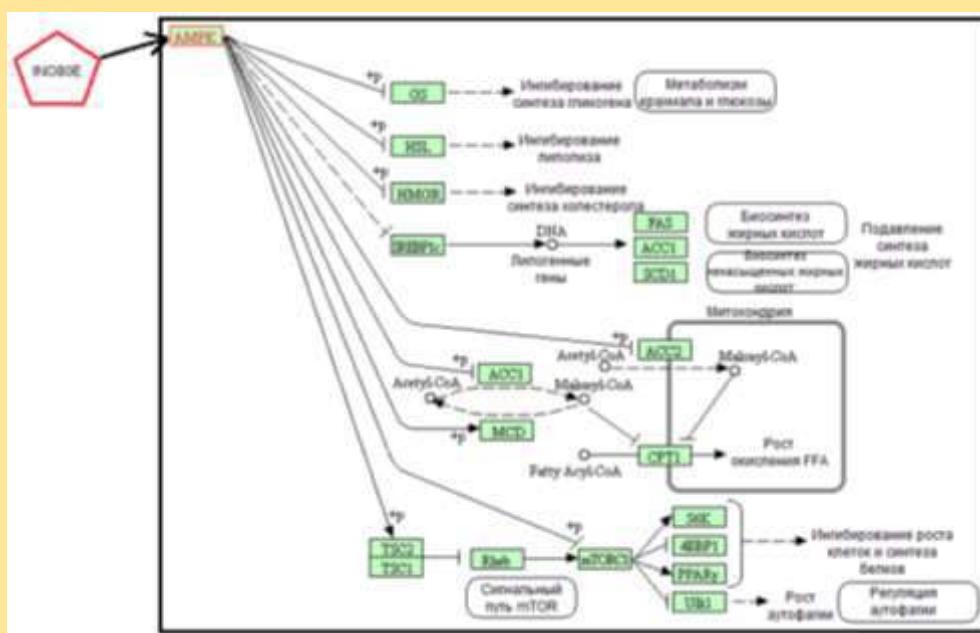
# Связи, включающие белки без биологической интерпретации

16

Интерактант 1: Белок без биологической интерпретации (в контексте развития ожирения)	Интерактант 2: Белок с биологической интерпретацией (в контексте развития ожирения)	Ссылка на статью, описывающую связь белков	Доказательство существования связи
GP2 • Glycoprotein 2	GLP1R • Glucagon like peptide 1 receptor	Dai F.F. et al. A Novel GLP1 Receptor Interacting Protein ATP6ap2 Regulates Insulin Secretion in Pancreatic Beta Cells. <i>J. Biol. Chem.</i> 2015; 41(290):25045–61.	Мембранный дрожжевой двугибридный анализ в сплит-убиквитиновой системе
DMXL2 • Dmx like 2	NPY2R • Neuropeptide Y receptor Y2	Huttlin E.L. et al. Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. <i>Nature.</i> 2017; 545(7655):505-509.	Масс-спектрометрический анализ аффинно-очищенных белковых комплексов
TAOK2 • TAO kinase 2	NMUR2 • Neuromedin U receptor 2		
INO80E • INO80 complex subunit E	AMPK • Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1	Rolland T. et al. A proteome-scale map of the human interactome network. <i>Cell.</i> 2014; 159(5):1212-1226.	Двугибридный анализ белок-белковых взаимодействий млекопитающих (MAPPIT), тест белковой комплементации (PCA), программируемый белковый матрикс нуклеиновой кислоты (NAPPA)

# Гипотетические механизмы участия белков INO80E, GP2 и DMXL2 в регуляции массы тела

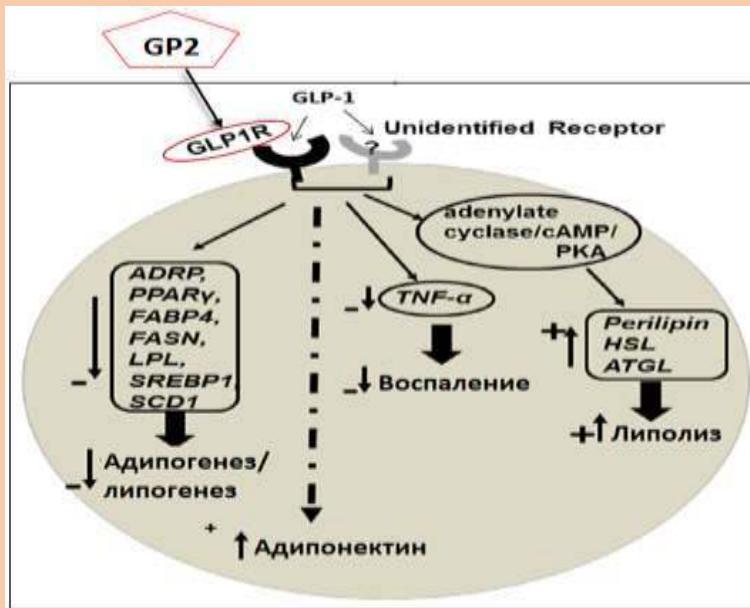
17



Влияние белка AMPK на биохимические процессы (фрагмент схемы “AMPK signaling pathway” из базы KEGG PATHWAY)

Интерактант 1: **INO80E** (INO80 complex subunit E) - субъединица Е хроматин-реконструирующего комплекса INO80.

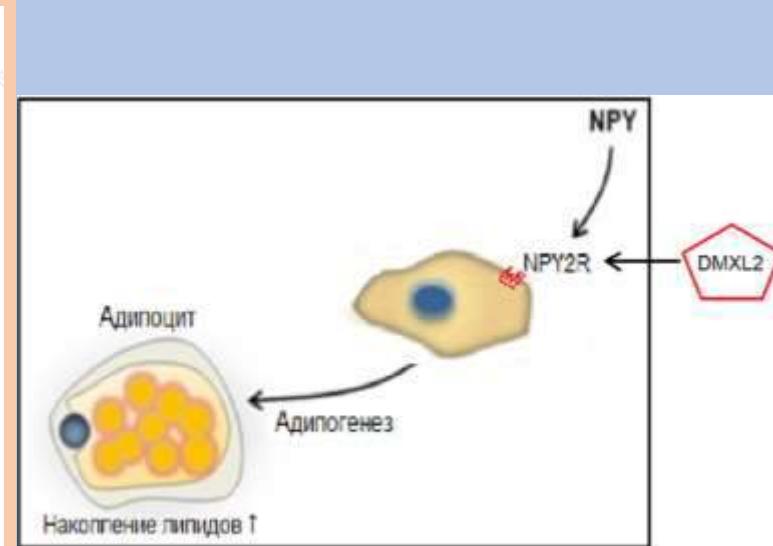
Интерактант 2: **AMPK** (Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1) - регулирует активность ряда ключевых метаболических ферментов посредством фосфорилирования.



Фрагмент схемы, отражающей механизм действия GP2 в жировой ткани, из статьи  
Bekay R. El et al., Br. J. Pharmacol 2016

Интерактант 1: **GP2** (Glycoprotein 2) - интегральный мембранный белок.

Интерактант 2: **GLP1R** (Glucagon like peptide 1 receptor) - рецептор GLP1, который влияет на наработку воспалительного цитокина TNF- $\alpha$ , липолиз и адипогенез.



Фрагмент схемы, отражающей механизм действия NPY в жировой ткани, из статьи  
Shin M.K., Choi B., Kim E.Y., Front Immunol 2018

Интерактант 1: **DMXL2** (Dmx like 2) - содержит 12 WD доменов и может выполнять каркасную функцию.

Интерактант 2: **NPY2R** (neuropeptide Y receptor Y2) - трансмембранный рецептор нейропептида Y, индуцирующего адипогенез.

# Выводы

1. Построены сети белок-белковых взаимодействий между белками, кодируемыми генами, которые контролируют массу тела и пищевое поведение, для общего списка генов (384 гена) и генов, экспрессирующихся в адипоцитах (356 генов) и клетках мозга (329 генов).
2. GO анализ списков белков, участвующих в сетях, показал, что они обогащены белками, участвующими в регуляции транскрипции, а также имеющими рецепторную активность либо опосредующими гормональную регуляцию.
3. Закономерности локализации транскрипционных регуляторов и трансмембранных рецепторов в реконструированных нами сетях белок-белковых взаимодействий различны. Во всех трех сетях транскрипционным регуляторам достоверно чаще соответствуют вершины с большим количеством связей и высокими значениями центральности и радиальности. Трансмембранным рецепторам, напротив, чаще соответствуют вершины с меньшим количеством связей и низкими значениями центральности и радиальности.
4. В регуляторных районах генов, контролирующих массу тела и выявленных в экспериментах GWAS, предсказано 638 потенциальных сайтов, на связывание которых с транскрипционными факторами могут повлиять нуклеотидные замены в районе локализации SNP. Из них 28 потенциальных сайтов могут быть мишениями транскрипционных факторов, участвующих в общей сети белок-белковых взаимодействий.
5. Для белков INO80E, GP2, DMXL2 и TAOK2 выявлены белок-белковые взаимодействия, позволяющие построить гипотетические механизмы их участия в регуляции массы тела.

Спасибо за внимание!

