

## ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ ВЪВ ВОДЕЩИ КАНДИДАТ-ГЕНИ ОТ ГЕНОМНИ АСОЦИАТИВНИ ПРОУЧВАНИЯ И ТЯХНАТА РОЛЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЯНЕ НА РИСКА ОТ РАЗВИТИЕ НА ИСХЕМИЧНА БОЛЕСТ НА СЪРЦЕТО – ВТОРА ЧАСТ

Р. ЦВЕОВА<sup>1,2</sup>, С. ВЪНДЕВА<sup>4</sup>, Й. МАТРОЗОВА<sup>4</sup>, Г. НАЙДЕНОВА<sup>5</sup>, Д. ПЕНДИЧЕВА-ДУХЛЕНСКА<sup>6</sup>, А. МИТКОВА<sup>1,2</sup>, С. ЗАХАРИЕВА<sup>4</sup>, Г. НАЧЕВ<sup>3</sup>, В. МИТЕВ<sup>1,2</sup> и Р. КЪНЕВА<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Център по Молекулна медицина, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Катедра “Медицинска химия и биохимия”, Медицински университет – София

<sup>3</sup>Университетска многопрофилна болница за активно лечение “Св. Екатерина” – София

<sup>4</sup>Клиничен център по ендокринология и геронтология, Медицински университет – София

<sup>5</sup>Втори департамент по кардиология, Университетска многопрофилна болница за активно лечение “Д-р Г. Странски” – Плевен

<sup>6</sup>Катедра „Експериментална и клинична фармакология, дерматология и венерология”, Медицински университет – Плевен

## POLYMORPHIC VARIANTS IN LEADING CANDIDATE-GENES FROM GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES AND CORONARY ARTERY DISEASE RISK – PART TWO

R. TZVEOVA<sup>1,2</sup>, S. VANDEVA<sup>4</sup>, Y. MATROZOVA<sup>4</sup>, G. NAYDENOVA<sup>5</sup>, D. PENDICHEVA-DUHLENSKA<sup>6</sup>, A. MITKOVA<sup>1,2</sup>, S. ZACHARIEVA<sup>4</sup>, G. NACHEV<sup>3</sup>, V. MITEV<sup>1,2</sup> AND R. KANEVA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Medicine Center, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Medical University – Sofia

<sup>3</sup>Sv. Ekaterina University, Multi-profile Active Treatment Hospital – Sofia

<sup>4</sup>Clinical Center of Endocrinology and Gerontology, Medical University – Sofia

<sup>5</sup>Second Department of Cardiology, University Multi-profile Active Treatment Hospital “Dr. G. Stranski”

<sup>6</sup>Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Dermatology and Venereology, Medical University – Pleven

**Резюме.** Ишемичната болест на сърцето (ИБС) представлява сложно, мултифакторно заболяване, в основата на което стоят както рисковите фактори на средата, така и генетичната предразположеност на всеки отделен индивид. Заболяването се дължи на атеросклероза на коронарните артерии, водеща до намаление на кръвоснабдяването на сърдечния миокард. Към класическите рискови фактори за развитие на ИБС се отнасят: повишеното съдържание на холестерол и липопротеини с ниска плътност в кръвта, артериалната хипертония (АХ), тютюнопушенето, наднорменото тегло, обездвижването, захарният диабет и други. Въпреки големия брой проучвания в тази насока генетиката на ИБС все още остава недобре изучена. Най-новите постижения в областта на молекулярната генетика, биология и биоинформатика позволяват да се проучи взаимодействието на екзогенните и ендогенните фактори, повлияващи риска от развитие на това заболяване. Първото геномно асоциативно проучване, свързано с ИБС, е проведено през 2007 г. от Samani и съавт. Впоследствие три други асоциативни проучвания от подобен мащаб успешно определят варианти, разположени върху хромозома 9p21.3, като силно свързани с риска от развитие на ИБС или миокарден инфаркт (МИ). По-късно множество геномни, асоциативни проучвания за различни етнoсни групи, разкриват асоциацията на над 50 генетични варианта с риска от развитие на ИБС и МИ.

**Ключови думи:** ишемична болест на сърцето, генетични проучвания, генетична предизпозиция, молекулярна генетика, асоциативни проучвания, полиморфни варианти

**Summary.** The coronary artery disease (CAD) is a complex, multifactorial disease caused by environmental risk factors and genetic predisposition of each subject. The atherosclerosis of coronary arteries results in reduction of blood supply to the heart myocardium. The classic risk factors for CAD include: total cholesterol

and LDL levels, arterial hypertension (AH), smoking, obesity, diabetes and others. Despite the large number of studies in this area, the genetics of CAD remains unexplained. Recent advances in molecular genetics, biology and bioinformatics allow studying the interaction of exogenous and endogenous factors that affect the risk of developing the disease. The first genomic analysis associated with CAD was conducted in 2007 by Samani et al. Subsequently, three other association studies successfully identified polymorphic variants located on chromosome 9p21.3 as strongly linked to the risk of CAD and myocardial infarction. Later, many genetic studies in various populations revealed associations of 50 genetic variants with higher risk of CAD and MI.

**Key words:** coronary artery disease, genetic studies, genetic predisposition, molecular genetics, association studies, polymorphic variants

Исхемичната болест на сърцето (ИБС) е сложно, мултифакторно заболяване, в основата на което стоят както рисковите фактори на средата, така и генетичната предразположеност на всеки отделен индивид. Заболяването се дължи на атеросклероза на коронарните артерии, водеща до намаление на кръвоснабдяването на сърдечния миокард.

Към рисковите фактори за развитие на ИБС се отнасят: повишеното съдържание на холестерол и липопротеини с ниска плътност в кръвта, захарният диабет и други. Въпреки големия брой проучвания в тази насока генетиката на ИБС все още остава недобре изучена. Най-новите постижения в областта на молекулярната генетика, биология и биоинформатика позволяват да се проучи взаимодействието на екзогенните и ендогенните фактори, повлияващи риска от развитие на това заболяване.

Според голям брой научни изследвания между 40 и 60% от предразположението към ИБС се дължи на генетични фактори. Доскоро изясняването и определянето на основните генетични компоненти на това заболяване беше затруднено поради мултифакторния му характер. Разработените и въведени в практиката през последните няколко години микрочипови технологии за скриниране на единични нуклеотидни полиморфизми в целия геном и последващия асоциативен анализ (GWAS) доведе до откриването на повече от 50 рискови за ИБС и миокарден инфаркт (МИ) генетични варианта [1-8]. Изненадващо е, че по-голяма част от установените рискови варианти упражняват своя рисков ефект чрез неизвестни до момента механизми, включително и клетъчна пролиферация, и само една малка част от тях се асоциират с АХ или нивата на липидите, които представляват основните рискови фактори за развитие на сърдечна исхемия [9].

Предполага се, че голяма част от базовите замени, асоцииращи се с ИБС, оказват регулаторен ефект върху други гени посредством своите белтъчни продукти или повлияват развитието на болестта чрез нови, неописани до този момент механизми. При установените до момента над 50 полиморфни варианта, рискови за ИБС, повишаването на риска от носителството им варира от 6 до 92%, като средният повишен риск е от 18% и възниква при средно 47% от населението [1]. Рисковите варианти следва да предоставят информация за патофизиологията на заболяването, както и нови прицелни точки за разработване на по-ефикасна терапия. Независимо от факта, че генетичните варианти имат по-ниска предиктивна стойност по отношение на риска от развитие на ИБС в сравнение с клиничните биомаркери, те имат своето голямо предимство, че не се променят през целия живот и не се повлияват от диета, пол, възраст или медикаментозно лечение [1].

Геномните асоциативни проучвания и техните метаанализи включват хиляди пациенти с ИБС и здрави лица, като статистическите показатели за идентифициране на генетични варианти са относително ниски и са свързани със сравнително слабо увеличение на риска от развитие на заболяването. Въпреки това търсенето на генетично базирани подобрения в лечението и превенцията на ИБС е все още в самото начало. Непознати до този момент механизми могат да осигурят обещаващи лекарствени цели и началото на нови интервенционални стратегии. Освен това сумата от рискови алели в различни рискови кандидат-гени би могла да улесни оценката на риска от развитие на въпросното заболяване, тъй като те предоставят допълнителна информация към тра-

диционните рискови фактори. Клиничните приложения на новооткритите полиморфни замени са все още далеч от рутинното им въвеждане и прилагане в лабораторната и клиничната практика. Разкриването на патофизиологичните механизми на тези генетични промени изисква множество допълнителни изследвания за изясняване на ролята им в етиологията на ИБС. Целта обаче на генетичните проучвания в областта на сърдечно-съдовата генетика е оценка на наследствения компонент и обсъждане на възможността за прилагане на съвременните познания в тази посока при бъдещото предвиждане на риска, превенция и лечение на коронарната атеросклероза.

Първото геномно асоциативно проучване, свързано с ИБС, е проведено през 2007 г. от Samani и съавт. Впоследствие 3 други асоциативни проучвания от подобен мащаб успешно определят варианти, разположени на хромозома 9p21.3, като силно свързани с риска от развитие на ИБС и МИ [10-13]. Впоследствие са проведени множество геномни, асоциативни проучвания за различни етносни групи, разкриващи асоциацията на над 50 генетични варианта с риска от развитие на ИБС и МИ [1-8, 14, 15]. Изясняването на ролята на по-голяма част от тях в механизмите, водещи до сърдечно-съдово увреждане, тепърва предстои.

Целта на обзора е да запознае читателя с част от генетичните локуси, показали статистически значима връзка с ИБС или МИ при различни популационни групи, както и опит за изясняване на потенциалната роля на тези варианти в етиологията и патофизиологията на атеросклеротичните усложнения. Част от обясненията представляват само предположения по отношение на вероятния механизъм на влияние, които впоследствие е необходимо да се потвърдят чрез функционални, протеомни или други видове позадълбочени анализи.

### **ADAMTS7**

Три от геномните асоциативни проучвания (GWASs), проведени през последните 3 години, показват, че ИБС се свързва с носителството на единични нуклеотидни полиморфизми в гена *ADAMTS7* (представляващ дизинтегрин и металопротеаза с тромбос-

пондинов мотив, 7 [MIM 605009]). Въпросният ген е локализиран върху дългото рамо на хромозома 15, локус 25 [14, 16]. Една от посочваните в тези проучвания базови замени е rs3825807, представляваща замяна на аденин (A) с гуанин (G) в кодиращата секвенция на ДНК, което води до замяна на аминокиселината серин (Ser) с пролин (Pro) в продомена на протеина *ADAMTS7*. В другите две проучвания за рискови за ИБС са посочени единичните нуклеотидни замени rs19940162 в интрон 8 на гена [8, 16] и rs43800283, разположен на разстояние 7.6 килобази upstream от *ADAMTS7* [8, 16]. Не става ясно обаче дали някой от тези полиморфизми или други варианти, намиращи се в неравновесна скаченост с тях, имат функционален ефект върху експресията и активността на *ADAMTS7*, като по този начин оказват влияние върху биологичните процеси, свързани с ИБС.

*ADAMTS* са семейство протеини, включващо 19 цинкови металопротеази. Тези протеини се синтезират в извънклетъчния матрикс, като си взаимодействат или разграждат определени негови компоненти. Някои членове на това семейството са с частично определени биологични функции, а на други те все още са в процес на изучаване. *ADAMTS13* е протеаза, участваща в протеолитичното срязване на фактора на Фон Вилебранд, като е известно, че мутации в този ген предизвикат заболяването тромботична тромбоцитопенична пурпура. *ADAMTS2*, *ADAMTS3* и *ADAMTS14* участват в регулацията на процеса на узряване на проколагена в зрял колаген чрез изрязване на N-терминалната област на препропротеина. Поради тази причина тези протеини са известни като проколаген-протеинази [17]. Известни са много други протеини от групата на *ADAMTS*, които свързват и срязват протеолитично множество протеогликани, като агрекан, версикан и бревикан [17].

*ADAMTS7* също принадлежи към *ADAMTS* семейството на металопротеиназите. Новосинтезираният протеин *ADAMTS7* съдържа сигнален пептид, продомен, металопротеиназен домен, дезинтегрин подобен домен и тромбоспондин тип-1 мотив [16]. По време на съзряването и активирането на *ADAMTS7* продоменът се отцепва от молекулата [16].

Активираният ADAMTS7 притежава протеолитична активност, като най-добре охарактеризираният му субстрат е тромбоспондин-5 (TSP5, известен също като хрущялен олигомерен матричен протеин, COMP) [16], представляващ извънклетъчен протеин, представен в съдовите стени и хрущялите [16].

Съвсем ново проучване при плъхове показва, че ADAMTS7 улеснява миграцията на съдовите гладкомускулни клетки (VSMC) посредством деградиране и разграждане на извънклетъчния матриксен протеин TSP5, като по този начин се стимулира образуването на неоинтима след съдово механично увреждане [16]. Освен това според *in vitro* проучвания VSMCs произвеждат TSP57 и TSP5 инхибира миграцията на VSMCs [16]. Процесът на миграция на VSMCs е изключително важен при атерогенезата. Именно затова би могло да се предположи, че ADAMTS7 е възможно да играе роля в развитието на атеросклерозата, която стои в основата на ИБС.

В свое проучване от 2013 г. Pu и съавт. установяват, че ADAMTS7 присъства в човешки атеросклеротични плаки, както и че вариации в локуса *ADAMTS7* се свързват с повишен риск от атеросклероза в общата популация. Резултатите от *in vitro* експериментите на същата изследователска група показват, че *ADAMTS7* генотипи, свързани с риск от ИБС, оказват и ефект върху съзряването на *ADAMTS7*, каталитичното срязване на TSP5 и миграцията на VSMCs [16].

Съществуват множество проучвания, свързващи протеините от ADAMTS с развитието на атеросклероза. ADAMTS1, ADAMTS4 и ADAMTS9 участват в протеолитичното срязване на версикан. Версиканът е протеогликан, силно експресиращ се в различни региони на васкулатурата, като предразполага към формиране на атероматозна плака [17]. Това предполага ролята на тези протеини във патофизиологията на ИБС. Множество ADAMTS протеини се експресират в областите на човешки каротидни лезии [17]. Конкретно, ADAMTS1 се локализира със съдовите гладкомускулни клетки (VSMCs) в самите лезии, като неговата експресия е по-висока в близост до мигриращите и пролифериращи VSMCs [17]. ADAMTS4 се локализира с макрофаги в атеросклеротичните лезии и по-

казва по-високи нива на експресия по време на развитие на атероматозните плаки в миши модели [17]. Освен това определени полиморфни варианти в гена *ADAMTS1* се свързват с увеличение почти 2 пъти на риска от развитие на сърдечно-съдова болест [17].

В метаанализ на геномни асоциативни проучвания от последните няколко години при пациенти с ИБС (12 393 бр.) и здрави контроли (7383 бр.) е установена силна асоциация със заболяването на полиморфен вариант в интрон на гена *ADAMTS7* ( $P = 5.0 \times 10^{-13}$ ) [17]. Това откритие се потвърждава от CARDIoGRAM consortium [17].

Статистическите анализи при асоциативни проучвания на целия геном, както и наблюдения при *in vitro* модели предполагат, че *ADAMTS7* играе съществена роля в атерогенезата вероятно чрез по-доброто проникване на VSMCs и миграцията в атеросклеротичните плаки. Тези резултати също правят *ADAMTS7* мишена за бъдещи проучвания и потенциал за терапевтични интервенции [17].

Всичко казано дотук предполага, че насоченото инхибиране на *ADAMTS7* би било един възможен нов подход за лечение на ИБС.

### ***SORT1-CELSR2-PSRC1***

Последните геномни асоциативни проучвания (GWAS) във връзка с изясняването на етиологията и патофизиологията на сърдечните увреждания показват силна позитивна връзка на единични нуклеотидни полиморфизми в локус 1p13.3 със заболяванията фамилна хиперхолестеролемия и МИ. За първи път този хромозомен локус показва статистически значима асоциация с ИБС и МИ при проучването на Wellcome Trust Case Control Consortium (полиморфният вариант е rs599839) [18]. Локус 1p13.3 показва най-силна асоциация с нивата на серумните липопротеини от който и да е друг генетичен локус в генома на човек [19].

Локусът 1p13.3 при човека обхваща 3 основни гена: *SORT1*, *CELSR2* и *PSRC1*. Генът *SORT1* кодира протеина сортилин, представляващ вътреклетъчен рецептор за аполипопротеин (Apo) B100. Въпросният рецептор взаимодейства с ApoB 100 в апарата на Голджи и улеснява формирането и експорта от черния дроб на ApoB 100-съдържащи ли-

попротеини, като по този начин участва в регулацията на липопротеините с ниска плътност (LDL) в плазмата. Липсата на синтез на сортилин в нокаут миши модели понижава секрецията на липопротеини от черния дроб и подобрява състоянието на хиперхолестеролемиа, както и образуването на атеросклеротична лезия в LDL рецептор-дефицитни животни. От друга страна, свръхекспресията на сортилин стимулира освобождаването от черния дроб на липопротеини, което води до повишаване на плазмените нива на LDLs и VLDLs. Именно поради тези причини молекулното обяснение на сърдечно-съдовите заболявания и регулацията на процеса на износ на липопротеини от черния дроб се свързват с локус 1p13.3.

Сортилин 1 е протеин, мултилиганд тип-1 рецептор, показващ високо сходство с дрожедвия карбоксипептидаза Y-сортиращ рецептор Vps10 протеин. Кодираният протеин (транс-Голджи (TGN) трансмембранен протеин свързва свободните лиганди, които участват в широк спектър от клетъчни процеси, но при него липсват типичните характеристики на рецептор от сигналния път. В TGN фузин медира активацията на зрялата форма на свързване на рецептора. Кодираният от гена SORT1 протеин съдържа голям луминален домен, един-единствен трансмембранен сегмент и къса C-терминална цитоплазмена опашка. Луминалният домен има регион, богат на цистеин, подобен на два от сегментите в Vps10p протеина на дрожди. Цитоплазмената опашка показва подобие с катион-независим манозо-6-фосфатен рецептор, като също така си взаимодейства с VHS домени на GGA (Голджи-свързан, гама-адаптин хомолог, ARF взаимодействащи) протеини [20].

Друг ген, разположен във въпросния участък е *PSRC1*, кодиращ богат на пролин протеин. Проучвания в тази област показват, че генът се регулира от p53 и вероятно участва в p53-медираното потискане на клетъчния растеж. Кодираният белтък може да функционира като микротубулен дестабилизиращ протеин, контролиращ динамиката на делителното вретено и митотичната прогресия чрез регулиране на микротубулната деполяризация. Най-малко една генетична вариация в този ген се свързва с понижава-

не на серумните нива на липопротеините с ниска плътност (LDLs) и холестерола [18].

Посредством геномен секвенционен анализ Lo и Wang през 2002 г. картират гена *PSRC1* върху хромозома 1p13.1 [18]. Същите автори установяват, че генът съдържа 8 екзона и обхваща регион с дължина 7.7 килобази [18]. През 2008 г. Hsieh и съавт. откриват три на брой p53 response elements (RE) в 5'- промоторния регион на гена [21].

*PSRC1* играе роля в растежа на клетките и клетъчното инхибиране. Тези процеси са от основно значение за формирането и прогресията на атеросклеротичната плака, а също и за нейната нестабилност. Резултатите от проведените до този момент проучвания показват, че генетичното регулиране на процесите играе важна роля в развитието на ИБС и МИ.

Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 е белтък, който при хората се кодира от гена *CELSR2* [22]. Този протеин е член на подсемейство протеини, наречено *фламинго*, което от своя страна пък е част от суперсемейството на кадхерините. Подсемейството на *фламинго*-протеините се състои от неklasически тип кадхерини, неспособни да взаимодействат с катенините. *Фламинго*-кадхерините са разположени в плазмената мембрана и в своя ектодомен притежава 9 кадхеринови домени, 7 епидермален растежен фактор-подобни повтора и 2 ламинин AG тип повтора. Тези кадхерини имат също така и 7 трансмембранны домена – характеристика, уникална за това подсемейство. Прието е, че тези протеини са рецептори, участващи в контакт-медираната комуникация. Със своите кадхеринови домени те действат като хомофилни свързващи региони, докато посредством седемте епидермален растежен фактор-подобни повтора участват в клетъчната адхезия и взаимодействията рецептор-лиганд [22].

Рисковият алел G ( $p = 0.014$ ) на полиморфния вариант rs599839 (представляващ еднонуклеотидна базова замяна A в G) е разположен върху хромозома 1p13.3 в 3' UTR нетранслируемия регион на гена *PSRC1*, в област, богата на пролин и серин и в близост до гена *CELSR2*. Това е генетичен локус в теломерната част на сегмент от 150 квб, свързан с нива-

та на LDL холестерол [23]. Известно е, че LDL холестеролът играе важна роля сред рисковите фактори за развитие на атеросклеротични лезии. Докато функционалното значение на PSRC1 и CELSR2 в липидния метаболизъм все още е неизяснена, е известно, че SORT1 ограничава действието на липопротеин липазата в чернодробните клетки [23].

Доказано е, че трите гена работят заедно, като повлияват метаболитния профил и атеросклеротичните промени при хората и в животински модели на гризачи. Минорният алел G на полиморфния вариант rs599839 се асоциира с повишени експресионни нива на SORT1 mRNA. Повишената експресия води до увеличен транспорт на LDL вътре в клетките [24]. Последните проучвания в тази насока показват, че свръхекспресията на SORT1 е в резултат на понижаване на нивата на плазмените холестерол и LDL-C в организма [25].

Проведените проучвания демонстрират, че потискането на експресията на SORT1 чрез siRNA води до 46% повишаване в нивата на общия холестерол в плазмата и повече от двукратно повишаване в стойностите на LDL холестерола (LDL-C) [25]. Това определя SORT1 в локус 1p13.3 като предполагаем ген, отговорен за редукция на плазмените нива на LDL-C, което от своя страна понижават риска от развитие на ИБС и МИ.

При пациенти с установено сърдечно заболяване носителството на полиморфен алел от въпросния локус се асоциира с по-високи плазмени LDL нива. Възможно е въпросните рискови алели да се асоциират и с повишен риск от ИБС или МИ при пациенти, третирани с липидопонижаващи медикаменти [26].

Публикувано през 2011 г. чешко проучване установява, че носителите на две копия от полиморфния алел на rs599838 имат значително понижен отговор към лечението със статини в сравнение с хомозиготите по дивия тип алел. Не са установени обаче значими асоциации с нивата на липиди в плазмата. Авторите от цитираното проучване предполагат, че заедно с вариации в други хромозомни локуси, генетичният вариант в локуса CELSR2/PSRC1/SORT1 може да се използва при индивидуализиране на лечението със статини и да доведе до по-добри резултати от терапията с тези медикаменти.

### **MIA3**

Генът MIA3 (Melanoma inhibitory activity family, member 3) е известен и под имената ARNT и TANGO1 (Transport and Golgi organization gene 1). MIA3 кодира третия член от семейството на меланома инхибитори и според някои автори вероятно представлява тумор-супресорен ген за злокачествен меланом [27]. MIA3/TANGO1 е необходим за експорта на колаген VII от ендоплазменния ретикулум към апарата на Голджи. MIA3/TANGO1 участва в зареждането на голям секреторен товар, съдържащ колаген VII върху COPII везикули при изхода на ендоплазменния ретикулум [27]. Наскоро бе установено, че MIA3/TANGO1 нокаут мишки са дефектни по отношение на секрецията на колагени I, II, III, IV, VII и IX [27, 28].

Намалената генна експресия на колагени е свързана с повишена честота на инфаркт на миокарда при миши модели [27], докато нивото на експресия на колаген III в проби аортна тъкан, получена при аортокоронарен байпас, е намалено при пациенти с остър миокарден инфаркт [27]. Промени в нивата на колагена могат да изменят състава на извънклетъчния матрикс, като е известно, че деградирането на компоненти от този матрикс се счита за важен компонент на атерогенезата чрез засягане на артериалното ремоделиране [27].

Освен това MIA3/TANGO1 улеснява миграцията на моноцити през фибриногена и ендотелните клетки, което е ключов процес на атеросклерозата и образуването на атероматозна плака [27]. Следователно може да се приеме, че MIA3/TANGO1 е силен кандидат-ген за ИБС и МИ. Генът е разположен в хромозомен локус 1q41 и най-често изследваният полиморфизъм в контекста на сърдечно заболяване е rs17465637. Според базата данни UCSC полмиорфният вариант rs17465637 е локализиран в интрон 1 на гена MIA3 [27].

За да може ясно да се дефинира връзката между въпросния локус и ИБС или МИ, е необходимо да се проведат множество анализи при MIA3/TANGO1 нокаут мишки с изключени ApoE или LDLR гени. По този начин би могло да се тества директно дали MIA3/TANGO1 е конкретният ген, промените в който повишават риска от развитие на

този тип заболявания [27]. Връзката между rs17465637 и ИБС е изследвана при различни популации от кавказката раса посредством мащабни геномни проучвания и валидирана в няколко независими изследвания [2]. Установено е, че често срещаният алел С на rs17465637 е рисков по отношение на ИБС и МИ при европейци [27]. Също така е установена потенциална връзка на *MIA3* rs17465637 с повишен риск от развитие на сърдечно-съдово заболяване в дислипидемични пациенти с ревматоиден артрит. Въпреки това са необходими допълнителни изследвания, за да се изясни по-добре ролята на гена *MIA3* в механизмите, водещи до ускорена атерогенеза [29].

### **HLA-C**

Механизмите, регулиращи прогресията и дестабилизацията на атероматозните лезии, са многобройни и сложни и протичат с участието на имунни и възпалителни процеси. Съществува хипотеза, според която както взаимодействието на клетки от имунната система, така и медиатори на възпалението са в основата на ендотелната дисфункция и последващото формиране на атеросклеротична плака. Според някои автори тъканната експресия на HLA антигените се повлиява от наличието на полиморфни варианти в гените, които ги кодират. Предишни изследвания предоставят доказателства за съществено участие на тези полиморфизми в заболявания, при които имунната дисрегулация има решаваща патогенетична роля, включително възпалителни медирирани заболявания при човека. МНС (major histocompatibility complex) системата и по-специално HLA гените са замесени в голямо разнообразие от заболявания, включително автоимунни заболявания на щитовидната жлеза, множествена склероза, псориазис, цъолиакия, системен лупус еритематозус, както и диабет тип 1 [30].

За първи път през 2012 г. широкомащабно геномно проучване, проведено от Robert W. Davies и неговия колектив, установява нова асоциация на хромозомен локус 6p21.3 и ИБС. Въпросното изследване включва индивиди от европейски произход, а далият асоциация локус е разположен в участъка от генома, кодиращ белтъците от главния комплекс за тъканна съвместимост при човека.

Полиморфният вариант rs3869109 е локализиран в междугенното пространство на гените *HCG27* и *HLA-C* [31].

Главният комплекс на тъканната съвместимост е известен още като МНС комплекс и представлява съвкупност от гени, кодиращи белтъци, участващи в имунния отговор. Тези протеини присъстват във всички ядрени соматични клетки, но не се установяват в човешки еритроцити [32]. Антигените от МНС комплекса се подразделят на два основни класа – МНС антигени от клас I и МНС антигени от клас II [32].

Човешките левкоцитни антигени (HLAs) А, В и С се отнасят към МНС клас I и са пептиди, намиращи се във вътрешността на клетките (в това число и вирусни пептиди). Тези пептиди са получени в резултат на протеини, разградени в протеазомата. Като цяло те представляват малки полимери, съдържащи около 9 аминокиселинни участъка. Чуждите антигени, представени от МНС клас I, атакуват Т-клетките (наречени още CD8 позитивни или цитотоксични Т-клетки), които разрушават клетките. HLAs, съответстващи на МНС клас II, кодират компонентите на системата на комплемента (DP, DM, DOA, DOB, DQ и DR). Тези специфични антигени стимулират размножаването на Т-хелперните клетки, които на свой ред стимулират антияло-продуциращите В-клетки, за да произведат антитела към специфичен антиген. Автоантигените се потискат от супресорни Т-клетки [32].

HLAs имат и други съществени функции. Те са важни при защита на организма от заболяване и са основната причина за отхвърляне на органи в резултат на трансплантация. Мутации в HLA гените могат се свързват с автоимунни заболявания (диабет тип 1, цъолиакия) [30].

Освен гените, кодиращи основните антиген-представящи протеини, в МНС комплекса има и голям брой други гени, участващи във функционирането на имунната система. Разнообразието на човешките левкоцитни антигени в човешката популация е в основата на защитата на организма от различни заболявания. Вероятността две несвързани лица да имат идентични HLA молекули за всички локуси е много малка. В миналото HLA гени са били идентифицирани като резултат на способността за успешно транс-

планиране на органи между HLA подобни индивиди [32, 33].

HLA-C принадлежи към MHC клас I тежковерижни рецептори. „C”-рецепторът е хетеродимер, състоящ се от HLA-C зрял генен продукт и  $\beta$ 2-микроглобулин. Зрялата „C”-верига е закотвена в мембраната на клетката. MHC молекулите от клас I – като HLA-C, се експресират в почти всички клетки и присъстват като малки пептиди на имунната система [32].

Молекули от клас I играят централна роля в имунната система чрез представяне на пептиди, получени от лумена на ендоплазмения ретикулум. Тежката верига е приблизително 45 кДа и съдържа екзон 8 от гена. Екзон 1 кодира водещия пептид, екзони 2 и 3 кодират алфа1- и алфа2-домени, които се свързват както пептид. Екзон 4 кодира домен алфа 3, екзон 5 – трансмембранната област, и екзони 6 и 7 кодират цитоплазмената опашка. Полиморфни варианти в екзон 2 и екзон 3 са отговорни за специфичността на свързване на всеки клас пептид. Описани са към настоящия момент над сто HLA-C алела [34].

### **FURIN**

Фурин представлява убиквитин-субтилизин-подобна пропротеин конвертаза. Това е основният ензим от секреторния път, локализиран в мрежата на транс-Голджи. Субстрати на ензима фурин са фактори на кръвосъсирването, серумни протеини и рецептори на различни растежни фактори, напр. рецептора на инсулин-подобния растежен фактор [35]. Мястото на действие на ензима е участъкът Arg-X-X-Arg. В различни белтъчни молекули ензимът разпознава и реже също така и в участъка Arg-X-(Lys/Arg)-Arg. Фурин се инхибира от различни съединения, като EGTA,  $\alpha$ 1-антитрипсин Портланд и полиаргининови съединения [36].

Фурин е протеин, който при хората се кодира от гена *FURIN*. Известно е, че някои белтъчни молекули се синтезират първоначално като неактивни съединения и е необходимо протеини да претърпят вътрешномолекулно срязване, за да се превърнат в активен генен продукт. Това е т.нар. процес на зреене на белтъчния продукт. При този процес белтъчната молекула претърпява поредица от посттранслационни модификации, докато се получи крайният активен

ензим. Фурин е ензимът, осъществяващ изрязването на определени вътремолекулни участъци от белтъчната молекула в точно определени участъци и осигуряващ нейното узряване. Причината за наименованието на ензима е, че се намира в upstream региона спрямо онкоген, известен като *FES*. Генът, кодиращ фурин, е известен като *FUR* (кое-то означава *FES upstream site*). Другото му наименование е *PACE* (paired basic amino acid cleaving enzyme).

Различни растежни фактори, хемокини, адхезионни молекули и протеолитични ензими са важни за клетка-клетка/клетка-матрикс взаимодействията при процесите на атеросклероза и рестеноза. Първоначално тези протеини се синтезират като неактивни прекурсори на активните белтъчни молекули. Активирането на въпросните пропротеини в биологично активни молекули се осъществява чрез вътрешномолекулно срязване на молекулата предшественик в точно определено място. Този тип на активиране обикновено изисква наличието на подходяща пропротеин-конвертаза. Фурин представлява калций-зависима серин-ендопротеаза. Някои от неговите субстрати са: пропаратиреоид хормон, трансформиращ растежен фактор бета 1 прекурсор; проалбумин; про-бета-секретаза; мембранен тип-1 матриксна металопротеиназа; бета-субединица на пронеурален растежен фактор и фактор на Фон Вилебранд [37].

Фурин като пропротеин-конвертаза участва в процесирването на хемоювелин – белтък, включен в тежко разстройство, свързано с излишък на желязо в организма. Заболяването се нарича ювенилна хемохроматоза. Изследователските групи на Ganz и Rotwein показват, че фурин-подобните пропротеин-конвертази са отговорни за преобразуване на 50 кДа HJV до 40 кДа протеин с пресечен COOH край и запазен полиосновен RNRR участък. Предполага се, че това е потенциалният механизъм за генериране на разтворими форми на хемоювелин (S-хемоювелин), намиращ се в кръвта на гризачи и хора [37].

Фурин е една от протеазите, отговорни за протеолитичното срязване на HIV полипротеинов прекурсор gp 160 в gp 20 и gp 41 преди асемблирането на вирусните час-

тици. Счита се, че генът играе роля в развитието на тумори. За него са известни няколко алтернативни места на полиаденилиране [38]. Най-голямо е количеството на фурин в апарата на Голджи. Експресията на фурин в Т-клетките е необходима за поддържане на периферния имунен толеранс [39]. Фурин е и високоекспресиран в човешки атероми и се предполага, че участва в образуването на съдови лезии чрез активирането на прекурсорни протеини, съществени за клетъчна пролиферация и миграция [40]. Установено е, че след съдово увреждане в *in vivo* животински модели фурин е свързоекспресиран. *In vitro* тези протеин-конвертази могат да регулират съдовите гладкомускулни клетки, както функционирането на макрофагите и различните сигнални пътища посредством активиране на про-алфа-интегрини и/или матриксни металопротеинази от проембранен тип. Интегрините осъществяват връзката на цитоскелета с извънклетъчния матрикс, медирайки двупосочна сигнализация и механотрансдукция, докато от своя страна матриксните металопротеинази представяват големи ензими, разграждащи извънклетъчния матрикс. И двата типа белтъчни молекули са необходими за формиране на интимата. Освен това сръзването на извънклетъчните матриксни молекули от металопротеиназите потенциално допринася за отслабване на фиброзната обвивка и стимулиране на руптурата на атеросклеротичната плака. Въз основа на тези последни *in vitro* и *in vivo* данни фурин се смята за потенциален участник в иницирането, прогресирането и усложнения на атеросклерозата и рестеноата на сърдечните артерии. Знанията за гена, кодиращ фурин и функциите на белтъка в бъдеще биха могли да се превърнат в разработване на нови таргетни терапии за лечение на атеросклероза. Разработването на нови протеазни инхибитори на фурин би улеснило създаването на бъдещи стратегии, насочени към пропротеин конвертазите в сърдечно-съдовите заболявания [40].

В заключение можем да твърдим, че през последните няколко години сме свидетели на изключително бързото развитие на технологиите за цялостно геномно сканиране, които позволиха откриване на голям брой гени и ло-

куси, чувствителни за ИБС и МИ при различни популационни групи. Това доведе до получаване на големи масиви от данни за генетичната основа на атеросклеротичните усложнения. Възможността за цялостно геномно сканиране дава възможност за провеждане на задълбочени изследвания в областта на мултифакторните заболявания. Въпреки това тълкуването на взаимодействията между известни генетични варианти с факторите на околната среда остава огромно предизвикателство пред изследователските групи от цял свят.

#### Библиография

1. Roberts, R. et al. F. Stewart. Genes and coronary artery disease: where are we? – *J. Am. Coll. Cardiol.*, **60**, 2012, № 18, 1715-1721.
2. Kathiresan, S. et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. – *Nat. Genet.*, **41**, 2009, № 3, 334-341.
3. Schunkert, H. et al. Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease. – *Nat. Genet.*, **43**, 2011, № 4, 333-338.
4. Consortium, I. K. C. Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease. – *PLoS Genet.*, **7**, 2011, № 9, e1002260.
5. Wang, F. et al. Genome-wide association identifies a susceptibility locus for coronary artery disease in the Chinese Han population. – *Nat. Genet.*, **43**, 2011, № 4, 345-349.
6. Gudbjartsson, D. F. et al. Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. – *Nat. Genet.*, **41**, 2009, № 3, 342-347.
7. McPherson, R. et al. A common allele on chromosome 9 associated with coronary heart disease. – *Science*, **316**, 2007, № 5830, 1488-1491.
8. Reilly, M. P. et al. Identification of ADAMT5 as a novel locus for coronary atherosclerosis and association of ABO with myocardial infarction in the presence of coronary atherosclerosis: two genome-wide association studies. – *Lancet*, **337**, 2011, № 9763, 383-392.
9. McPherson, R. From genome-wide association studies to functional genomics: new insights into cardiovascular disease. – *Can. J. Cardiol.*, **29**, 2013, № 1, 23-29.
10. Consortium, W. T. C. C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. – *Nature*, **447**, 2007, № 7145, 661-678.
11. Helgadottir, A. et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction. – *Science*, **316**, 2007, № 5830, 1491-1493.
12. Kessler, T., J. Erdmann et H. Schunkert. Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction–2013. – *Curr. Cardiol. Rep.*, **15**, 2013, № 6, 368.
13. Samani, N. J. et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. – *N. Engl. J. Med.*, **357**, 2007, № 5, 443-453.
14. Consortium, C. A. D. C. D. G. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. – *Nat. Genet.*, **43**, 2011, № 4, 339-344.
15. Deloukas, P. et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. – *Nat. Genet.*, **45**, 2012, № 1, 25-33.

16. Pu, X. et al. ADAMTS7 cleavage and vascular smooth muscle cell migration is affected by a coronary-artery-disease-associated variant. – *Am. J. Hum. Genet.*, **92**, 2013, № 3, 366-374.
17. Stylianou, I. M. et al. Genetic basis of atherosclerosis: insights from mice and humans. – *Circ. Res.*, **110**, 2012, № 2, 337-55.
18. Lo, P. K. et F. F. Wang. Cloning and characterization of human and mouse DDA3 genes. – *Biochim. Biophys. Acta*, **1579**, 2002, № 2-3, 214-218.
19. Teslovich, T. M. et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. – *Nature*, **466**, 2010, № 7307, 707-713.
20. Jacobsen, L. et al. The sorLA cytoplasmic domain interacts with GGA1 and -2 and defines minimum requirements for GGA binding. – *FEBS Lett.*, **511**, 2002, № 1-3, 155-158.
21. Hsieh, W. J. et al. Human DDA3 is an oncoprotein down-regulated by p53 and DNA damage. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **369**, 2008, № 2, 567-572.
22. Nakayama, M. et al. Identification of high-molecular-weight proteins with multiple EGF-like motifs by motif-trap screening. – *Genomics*, **51**, 1998, № 1, 27-34.
23. Samani, N. J. et al. The novel genetic variant predisposing to coronary artery disease in the region of the PSRC1 and CELSR2 genes on chromosome 1 associates with serum cholesterol. – *J. Mol. Med. (Berl.)*, **86**, 2008, № 11, 1233-1241.
24. Linsel-Nitschke, P., J. Erdmann et H. Schunkert. [Identification of risk genes for myocardial infarction by genome wide association studies]. – *Hamostaseologie*, **30**, 2010, № 4, 230-235.
25. Musunuru, K. et al. From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. – *Nature*, **466**, 2010, № 7307, 714-719.
26. Van de Woestijne, A. P. et al. LDL-c linked SNPs are associated with LDL-c and myocardial infarction despite lipid-lowering therapy in patients with established vascular disease. – *Eur. J. Clin. Invest.*, 2013.
27. Li, X. et al. Meta-analysis identifies robust association between SNP rs17465637 in MIA3 on chromosome 1q41 and coronary artery disease. – *Atherosclerosis*, **231**, 2013, № 1, 136-140.
28. Wilson, D. G. et al. Global defects in collagen secretion in a Mia3/TANGO1 knockout mouse. – *J. Cell Biol.*, **193**, 2011, № 5, 935-951.
29. Garcia-Bermudez, M. et al. Association study of MIA3 rs17465637 polymorphism with cardiovascular disease in rheumatoid arthritis patients. – *DNA Cell Biol.*, **31**, 2012, № 8, 1412-1417.
30. Davies, R. W. et al. A genome-wide association study for coronary artery disease identifies a novel susceptibility locus in the major histocompatibility complex. – *Circ. Cardiovasc. Genet.*, **5**, 2012, № 2, 217-225.
31. Bodmer, W. F. The HLA system: structure and function. – *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1987, № 9, 948-958.
32. Barnstable, C. J. et J. E. Bodmer. Genetic structure of major histocompatibility regions. Lennox ES. International review of biochemistry. Defense and recognition. IIA:22. Cellular aspects. Baltimore: University Park Press, 51, 1979.
33. Harrison, C. Cardiovascular drugs: a determinant of clopidogrel efficacy. – *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, № 2, 100.
34. Bravo, D. A. et al. Accurate and efficient cleavage of the human insulin proreceptor by the human proprotein-processing protease furin. Characterization and kinetic parameters using the purified, secreted soluble protease expressed by a recombinant baculovirus. – *J. Biol. Chem.*, **269**, 1994, № 41, 25830-25837.
35. Cameron, A. et al. Polyarginines are potent furin inhibitors. – *J. Biol. Chem.*, **275**, 2000, № 47, 36741-36749.
36. Kuningger, D. et al. Pro-protein convertases control the maturation and processing of the iron-regulatory protein, RGMc/hemojuvelin. – *BMC Biochem.*, **9**, 2008, 9.
37. Hwang, S. J. et al. The cytochrome 2C19\*2 and \*3 alleles attenuate response to clopidogrel similarly in East Asian patients undergoing elective percutaneous coronary intervention. – *Thromb. Res.*, **127**, № 1, 23-28.
38. Pesu, M. et al. T-cell-expressed proprotein convertase furin is essential for maintenance of peripheral immune tolerance. – *Nature*, **455**, 2008, № 7210, 246-250.
39. Stawowy, P. et K. Kappert. The molecular biology of furin-like proprotein convertases in vascular remodelling. – *Methods Mol. Biol.*, **768**, 2011, 191-206.

Постъпила – 15.04.2014 г.

✉ Адрес за кореспонденция:

Рени Цвеова  
 Център по молекулна медицина  
 Медицински университет  
 ул. „Св. Г. Софийски“ № 1  
 1431 София

✉ Address for correspondence:

Reni Tzveova  
 Molecular Medicine Center  
 Medical University  
 1 Sv. G. Sofiyski st.  
 Bg – 1431 Sofia