

## Экспрессия генов *DROSHA* и *DICER* в лейкоцитах периферической крови при саркоидозе легких

И.Е. МАЛЫШЕВА<sup>1</sup>, О.В. БАЛАН<sup>1</sup>, Э.Л. ТИХОНОВИЧ<sup>2</sup>, Т.О. ВОЛКОВА<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Институт биологии Карельского научного центра РАН, Петрозаводск, Россия;

<sup>2</sup>Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ ВО «Петрозаводский государственный университет», Петрозаводск, Россия

### Резюме

**Цель исследования** – изучить уровень экспрессии генов *DROSHA* и *DICER* в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных саркоидозом легких.

**Материалы и методы.** В исследование включено 32 пациента с диагнозом персистирующий саркоидоз легких (средний возраст  $41,56 \pm 1,27$  года) и 36 здоровых доноров (контроль; средний возраст  $42,79 \pm 1,95$  года). Уровень экспрессии матричной РНК (мРНК) генов *DROSHA* и *DICER* определяли в ЛПК здоровых доноров и больных саркоидозом легких методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

**Результаты.** Установлено, что уровень экспрессии гена *DROSHA* в ЛПК больных саркоидозом легких значительно снижен по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Нами также обнаружено достоверное снижение количества транскриптов гена *DICER* в ЛПК исследуемой группы больных ( $p < 0,01$ ).

**Заключение.** Установлено значимое снижение количества транскриптов генов *DROSHA* и *DICER* в ЛПК больных при развитии саркоидоза легких, что может вносить определенный вклад в патогенез данного заболевания.

*Ключевые слова:* саркоидоз легких, микроРНК, биогенез микроРНК, гены *DROSHA* и *DICER*, экспрессия.

## Expression of *DROSHA* and *DICER* genes in peripheral blood leukocytes in lung sarcoidosis

I.E. MALYSHEVA<sup>1</sup>, O.V. BALAN<sup>1</sup>, E.L. TIKHONOVICH<sup>2</sup>, T.O. VOLKOVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>IB KarRC RAS, laboratory of genetics, Petrozavodsk, Russia;

<sup>2</sup>Republican Hospital named after. V.A. Baranov, Petrozavodsk, Russia;

<sup>3</sup>Petrozavodsk state University, Department of Hospital Therapy, Petrozavodsk, Russia

### Summary

**Aim.** To study the expression level of the genes *DROSHA* and *DICER* in peripheral blood leukocytes (PBL) of patients with sarcoidosis of the lungs

**Materials and methods.** The study included 32 patients diagnosed with persistent lung sarcoidosis (mean age  $41.56 \pm 1.27$  years) and 36 healthy donors (control; mean age  $42.79 \pm 1.95$  years). The level of expression of messenger RNA (mRNA) of the genes *DROSHA* and *DICER* were determined in PBL of healthy donors and patients with sarcoidosis of the lung by polymerase chain reaction in real time.

**Results.** As a result of the conducted researches it is established that the level of drosha gene expression in PBL patients with sarcoidosis of lungs is significantly reduced in comparison with the control ( $p < 0.01$ ). We also found a significant decrease in the number of Dicker gene transcripts in the PBL of the study group of patients ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion.** According to the results of the conducted studies, a significant decrease in the number of *DROSHA* and *DICER* transcripts in PBL patients with the development of lung sarcoidosis has been found, which can contribute to the pathogenesis of this disease.

*Keywords:* sarcoidosis of the lung, microRNA, microRNA biogenesis, *DICER* and *DROSHA* genes expression.

ЛПК – лейкоциты периферической крови

мРНК – матричная РНК

микроРНК – малые некодирующие молекулы РНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция реального времени

тРНК – тотальная РНК

Саркоидоз (болезнь Бенье-Бека-Шауманна) – системное воспалительное заболевание неизвестной этиологии, которое характеризуется образованием неказеинфицирующихся гранулем в различных органах и тканях. Патологический процесс наиболее часто локализуется в легких [1]. В большинстве случаев заболевание заканчивается спонтанной ремиссией, однако в 20% наблюдается прогрессирующее течение с последующим развитием фиброза легких и респираторной недостаточности [2, 3]. Среди многих факторов риска, инфекционной или неинфекционной природы, генетическая предрасположенность, по-видимому, играет ключевую роль при данном заболевании [4, 5]. Известно, что к таким генетическим детерминантам относятся иммунорегуляторные гены, продукты которых регулируют различные аспекты морфо- и ангиогенеза (пролифе-

рация, апоптоз, миграция и др.), ангиостаз, а также участвуют в патогенезе фиброза легких [4, 6–8].

В настоящее время в ряде исследований показано, что при саркоидозе легких, так же как и при многих других патологических состояниях, имеет место нарушение экспрессии некоторых малых некодирующих молекул РНК (микроРНК) [9–12]. МикроРНК действуют как небольшие отрицательные регуляторы экспрессии генов посредством снижения трансляции белка или дегградации мРНК [13,14]. Аберрантная экспрессия микроРНК приводит к дизрегуляции различных сигнальных путей, регулирующих нормальное функционирование клетки [15]. Кроме того, показано нарушение транскрипционной активности генов, вовлеченных в процесс биогенеза микроРНК [10, 16]. Биогенез (формирование зрелой молекулы микроРНК) – это слож-

ный многоступенчатый процесс, который начинается в ядре клетки при участии различных белковых комплексов. В ходе биогенеза микроРНК процессируется от молекулы пре-микроРНК (первичный транскрипт длиной порядка 1000 нуклеотидов) до зрелой микроРНК размером около 25 нуклеотидов [13]. Ключевую роль в биогенезе микроРНК играют рибонуклеазы *DROSHA* и *DICER* [17]. *DROSHA* (ядерная рибонуклеаза III типа) в комплексе с белком DDG8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) расщепляет первичный транскрипт (пре-микроРНК) в короткий (~70 пар нуклеотидов) предшественник микроРНК (пре-микроРНК). В дальнейшем пре-микроРНК транспортируется в цитоплазму клетки, где процессируется в небольшие РНК-дуплексы микроРНК: микроРНК (~22 пары нуклеотидов) при участии рибонуклеазы III типа *DICER* [18]. В настоящее время, несмотря на имеющиеся уже результаты исследований по изучению роли отдельных микроРНК в патогенезе саркоидоза легких, в литературе нет информации о том, как при данном заболевании изменяется транскрипционная активность генов, вовлеченных в процесс биогенеза микроРНК, а именно *DROSHA* и *DICER*. В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в изучении уровня экспрессии генов *DROSHA* и *DICER* в ЛПК больных саркоидозом легких.

## Материалы и методы

В исследование включено 68 человек: 32 больных с диагнозом персистирующий саркоидоз легких (средний возраст  $41,56 \pm 1,27$  года) и 36 здоровых доноров (контроль; средний возраст  $42,79 \pm 1,95$  года). Материал для исследований получен при содействии отделения респираторной терапии Республиканской больницы им. В.А. Баранова. Диагноз «саркоидоз легких» установлен на основании клинико-рентгенологических изменений, подтвержден морфологически. У всех пациентов саркоидоз верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Оценены результаты функциональных тестов пациентов, исключая пациентов с диагностируемыми в анамнезе бронхиальной астмой и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). В 4,3% случаев выявлены рестриктивные, в 2,3% – обструктивные нарушения. Данные изменения зарегистрированы у пациентов со II–III стадией заболевания. Снижение диффузионной способности легких выявлено у 3,7% пациентов [снижение переноса оксида углерода (DLco) и низкое отношение DLco к объему альвеолярного газа (DLco/Va), что характерно для паренхиматозных нарушений]. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела  $\geq 28$  кг/м<sup>2</sup>. Пациенты, включенные в настоящее исследование, не принимали каких-либо лекарственных препаратов (в том числе гормональных) и находились в состоянии ремиссии. Материалом служили пробы периферической крови. Забор венозной крови осуществлялся утром натощак. Информационное согласие получено от всех пациентов. Работа утверждена Этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова».

### Сведения об авторах:

Балан Ольга Викторовна – с.н.с. лаборатории генетики  
Тихонович Элла Леонидовна – зав. отд-нием респираторной терапии  
Волкова Татьяна Олеговна – д.б.н., проф.

Тотальную РНК (тРНК) из клеток крови выделяли на колонках Ахуреп Multisource Total RNA Miniprep Kit («Ахуреп», США). Для удаления остатков ДНК растворов тРНК обрабатывали ДНКазой («Сибэзим», Россия) (1 е.а.) при 37°C в течение 30 мин. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) осуществляли с помощью набора MMLV RT kit («Евроген», Россия). Экспрессию генов *DROSHA* и *DICER* оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе iCycler iQ5 («Bio-Rad», США). Для амплификации использовали наборы qPCRmix-HS SYBR. Последовательность праймеров для ПЦР-РВ («Евроген», Россия) указана в работе X. Guo и соавт. [19]. Уровень экспрессии генов *DROSHA* и *DICER* рассчитывали относительно уровня экспрессии референсного гена *GAPDH*. ПЦР-РВ для каждого образца проводили не менее трех раз. Специфичность продуктов амплификации проверяли плавлением ПЦР-фрагментов. Эффективность ПЦР (98%) оценивали по стандартной кривой. Уровень транскриптов генов вычисляли по  $\Delta\Delta CT$  [20].

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета программ «StatGraphics 2.1.». Достоверность различий уровня транскриптов исследуемых генов между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm SD$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования ИБ КарНЦ РАН «Комплексные фундаментальные и прикладные исследования особенностей функционирования живых систем в условиях Севера».

## Результаты

Известно, что при развитии саркоидоза легких наблюдается aberrantная экспрессия некоторых микроРНК [11, 21]. Регистрируемые нарушения могут быть причиной дисрегуляции экспрессии других генов, вовлеченных в патогенез данного заболевания. В проведенном нами исследовании показано, что уровень экспрессии мРНК гена *DROSHA* в ЛПК больных саркоидозом легких значимо снижен по сравнению с группой здоровых доноров (рис. 1). Также отмечено достоверное снижение количества транскриптов гена *DICER* в ЛПК исследуемых больных по сравнению с группой контроля (рис. 2).

## Обсуждение

По данным литературы, изменения экспрессии некоторых микроРНК, а также генов, вовлеченных в биогенез микроРНК, таких как *DROSHA* и *DICER*, отмечены при ряде иммуновоспалительных заболеваний. Так, снижение транскрипционной активности генов *DROSHA* и *DICER* в ЛПК установлено у больных с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, таких как тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса [10]. Авторы исследования предполагают, что снижение уровня экспрессии указанных генов может приводить к снижению уровня таких микроРНК, как miR-27b, miR-let7f, miR-21, miR-98, которые ассоциированы с развитием воспаления при данных заболеваниях.

### Контактная информация:

Малышева Ирина Евгеньевна – с.н.с. лаборатории генетики,  
e-mail: i.e.malysheva@yandex.ru; тел.: 8(142)57-18-79 (раб.),  
+7(953)532-49-35 (моб.)

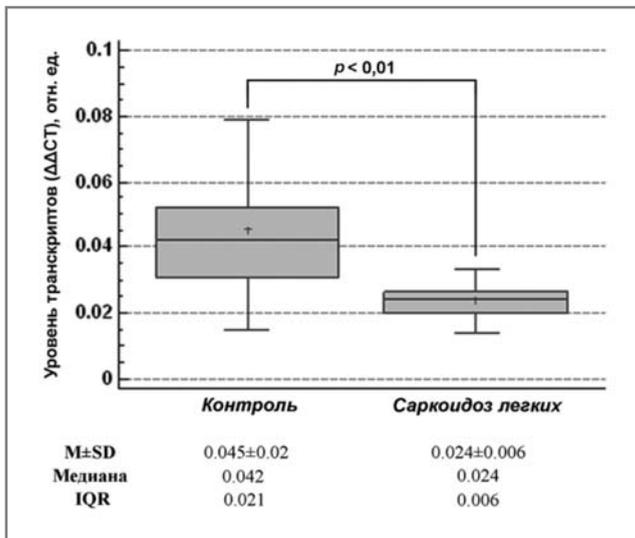


Рис. 1. Уровень экспрессии мРНК гена *DROSHA* в ЛПК здоровых доноров и больных саркоидозом легких ( $p < 0,01$  по сравнению с контролем).

M±SD – среднее значение ± стандартное отклонение;  
IQR – межквартильный размах.

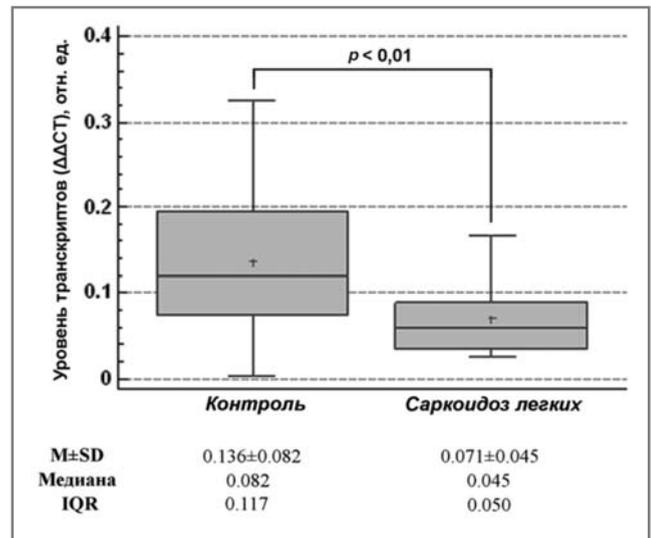


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК гена *DICER* в ЛПК здоровых доноров и больных саркоидозом легких ( $p < 0,01$  по сравнению с контролем).

M±SD – среднее значение ± стандартное отклонение;  
IQR – межквартильный размах.

Снижение количества транскриптов гена *DICER* в ЛПК показано в исследовании W. Magner и соавт. у больных с рассеянным склерозом в ответ на проводимую терапию IFNβ1a. Авторами исследования показано, что изменение экспрессии гена *DICER* может коррелировать с тяжестью, клиническим течением патологии и ответом на терапию [9]. Аналогичные результаты по изменению транскрипционной активности указанного гена обнаружены в культуре синовиоцитов, полученных от больных ревматоидным артритом [22]. Однако следует отметить, что при некоторых иммуновоспалительных заболеваниях экспрессия мРНК генов *DROSHA* и *DICER* может быть повышена. Так, в работе Rostami Mogaddam M. и соавт. показано достоверное увеличение количества транскриптов указанных генов в клетках биоптатов кожи, полученных от больных псориазом [23].

В проведенном нами исследовании отмечено снижение количества транскриптов генов, ключевых регуляторов биогенеза микроРНК, таких как *DROSHA* и *DICER* в ЛПК больных саркоидозом легких. Мы предполагаем, что снижение экспрессии исследуемых генов может играть определенную роль в патогенезе данного заболевания. В ряде работ отмечено, что прогрессия саркоидоза не ассоциирована с изменением каких-либо специфических, характерных для данного заболевания иммунологических параметров. Хотя наблюдаемое при данной патологии гранулематозное воспаление характеризуется повышением продук-

ции протеолитических ферментов, цитокинов, лигандов/рецепторов хемокинов и других молекул с иммунорегуляторными функциями [24, 25]. Экспрессия этих провоспалительных факторов может модулироваться различными микроРНК, регулирующими важные сигнальные пути в клетке. По мнению ряда авторов, изменение экспрессии некоторых микроРНК, которое наблюдается в различных типах клеток при саркоидозе легких, может играть определенную роль в патогенезе данного заболевания и выступать в качестве прогностического маркера развития и прогрессирования патологии [11].

## Заключение

Результаты проведенного нами исследования показали, что уровень экспрессии генов *DROSHA* и *DICER* в ЛПК снижается при развитии саркоидоза легких, что может вносить определенный вклад в патогенез данного заболевания. Однако функциональная значимость снижения количества транскриптов генов, вовлеченных в биогенез микроРНК, до конца не выяснена.

**Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств гранта Правительства РФ по постановлению № 220 (договор № 11.G34.31.0052) и федерального бюджета на выполнение государственного задания (тема № 0221-2014-0034).**

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Саркоидоз: Монография. Под ред. А.А. Визеля. Серия монографий Российского респираторного общества. Гл. ред. серии А.Г. Чучалин. М.: Атмосфера, 2010. [Sarcoidosis: Monograph. Under the editorship of A. A. Wiesel. A series of monographs Of the Russian respiratory society. GL. series edited by A. G. Chuchalin. M.: Atmosfera, 2010. (In Russ.).]
2. He L, Hannon G. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature reviews. Genetics*. 2004; 5 (7): 522-531. doi: 10.1038/nrg1379
3. Lynch J, Ma Y, Koss M, White E. Pulmonary sarcoidosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2007; 28(1):53-74. doi: 10.1055/s-2007-970333.
4. Iannuzzi M, Rybicki B, Teirstein A. Sarcoidosis. *The New England journal of medicine*. 2007; 357: 2153-2165. doi: 10.1056/NEJMra071714
5. Lazarus A. Sarcoidosis: epidemiology, etiology, pathogenesis, and genetics. *Disease-a-month: DM*. 2009; 55: 649-660. doi: 10.1016/j.disease-month.2009.04.008

6. Spagnolo P, Grunewald J. Recent advances in the genetics of sarcoidosis. *Journal of medical genetics*. 2013; 50: 290-297. doi: 10.1136/jmed-genet-2013-101532.
7. Tzouvelekis A, Ntoliou Tzouvelekis A, Ntoliou P, Karameris A, Koutsopoulos A, Boglou P, Koulelidis A, Archontogeorgis K, Zacharis G, Drakopanagiotakis F, Steiropoulos P, Anevlavis S, Polychronopoulos V, Mikroulis D, Bouros D. Expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ -vascular endothelial growth factor (VEGF)-inhibitory growth factor (ING)-4- axis in sarcoidosis patients. *BMC research notes*. 2012; 5: 654. doi: 10.1186/1756-0500-5-654
8. Wu F, Yang Z, Li G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009; 386: 549-553. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.06.075
9. Magner W, Weinstock-Guttman B, Rho M, Hojnacki D, Ghazi R, Ramanathan M, Tomasi T. Dicer and microRNA expression in multiple sclerosis and response to interferon therapy. *Journal of neuroimmunology*. 2016; 292: 68-78. doi: 10.1016/j.jneuroim.2016.01.009
10. Saeki M, Watanabe M, Inoue N, Tokiyoshi E, Takuse Y, Arakawa Y, Hidaka Y, Iwatani Y. DICER and DROSHA gene expression and polymorphisms in autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity*. 2016; 49 (8): 514-522. doi: 10.1080/08916934.2016.1230846
11. Kiszalkiewicz J, Piotrowski W, Pastuszek-Lewandoska D, Górski P, Antczak A, Górski W, Domańska-Senderowska D, Migdalska-Sęk M, Czarnecka KH, Nawrot E, Brzezińska-Lasota E. Altered miRNA expression in pulmonary sarcoidosis. *BMC medical genetics*. 2016; 17: 2. doi: 10.1186/s12881-016-0266-6
12. Jazwa A, Kasper L, Bak M, Sobczak M, Szade K, Jozkowicz A, Sladek K, Dulak J. Differential inflammatory microRNA and cytokine expression in pulmonary sarcoidosis. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 2015; 63 (2): 139-146. doi: 10.1007/s00005-014-0315-9
13. Баулина Н.М., Кулакова О.Г., Фаворова О.О. МикроРНК: роль в развитии аутоиммунного воспаления. *Acta Naturae*. 2016; 8 (1): 23-35. [Baulina NM, Kulakova OG, Favorova OO. MicroRNAs: role in the development of autoimmune inflammation. *Acta Naturae*. 2016; 8 (1): 23-35. (In Russ.)]. <http://elibrary.ru/item.asp?id=25790907>
14. Bartel D. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136: 215-233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002
15. Федоров А.В., Костарева А.А. Современные методы модулирования и визуализация эндогенных микроРНК. *Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова*. 2012; (5): 77-81. [Fedorov AV, Kostareva AA. Modern methods of modulation and visualization of endogenous microRNAs. *Bulletin of the Federal center of heart, blood and endocrinology them. V. A. Almazov*. 2012; (5): 77-81. (In Russ.)] <http://elibrary.ru/item.asp?id=18828562>
16. Kim S, Lee J, Nam S. Dicer Is Down-regulated and Correlated with Drosha in Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Journal of Korean medical science*. 2015; 30 (8): 1183-1188. doi: 10.3346/jkms.2015.30.8.1183
17. Jackson RJ, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? Science's signal transduction knowledge environment. 2007; (367): re1. doi: 10.1126/stke.3672007re1
18. Yates L, Norbury C, Gilbert R. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013; 153 (3): 516-519. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.003
19. Guo X, Liao Q, Chen P, Li X, Xiong W, Ma J, Li X, Luo Z, Tang H, Deng M, Zheng Y, Wang R, Zhang W, Li G. The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2012; 138 (1): 49-56. doi: 10.1007/s00432-011-1058-1
20. Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
21. Dyskova T, Fillerova R, Novosad T, Kudelka M, Zurkova M, Gajdos P2, Kolek V, Kriegova E. Correlation Network Analysis Reveals Relationships between MicroRNAs, Transcription Factor T-bet, and Deregulated Cytokine/Chemokine-Receptor Network in Pulmonary Sarcoidosis. *Mediators of inflammation*. 2015: 121378. doi: 10.1155/2015/121378
22. Alsaleh G, Nehmar R, Blüml S, Schleiss C, Ostermann E, Dillenseger J, Sayeh A, Choquet P, Dembele D, Francois A, Salmon J, Paul N, Schabbauer G, Bierry G, Meyer A, Gottenberg J, Haas G, Pfeffer S, Vallat L, Sibilia J, Bahram S, Georgel P. Reduced DICER1 Expression Bestows Rheumatoid Arthritis Synoviocytes Proinflammatory Properties and Resistance to Apoptotic Stimuli. *Arthritis & rheumatology (Hoboken NJ)*. 2016; 68 (8): 1839-1848. doi: 10.1002/art.39641
23. Rostami Mogaddam M, Safavi Ardabili N, Shafaei Y, Maleki N, Jafari N5, Jafari A. Overexpression of Drosha, DiGeorge syndrome critical-region gene 8 (DGCR8), and Dicer mRNAs in the pathogenesis of psoriasis. *Journal of cosmetic dermatology*. 2017. doi: 10.1111/jocd.12336. [Epub ahead of print]
24. Valeyre D, Prasse A, Nunes H, Uzunhan Y, Brillet P, Müller-Quernheim J. Sarcoidosis. *Lancet*. 2014; 383 (9923): 1155-1167. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60680-7
25. Zissel G, Müller-Quernheim J. Specific antigen(s) in sarcoidosis: a link to autoimmunity? *The European respiratory journal*. 2016; 47 (3): 707-709. doi: 10.1183/13993003.01791-2015.

Поступила 23.05.2017