

УДК 577.2+577.29+577.151.45+577.214.5+577.216.3+616-006.6+616-092.4

## РАЗЛИЧИЯ В РАБОТЕ ФЕРМЕНТОВ DROSHA И DICER В ОБРАЗЦАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ТОЛСТОЙ КИШКИ

© 2020 г. М. Ю. Шкурников<sup>1,\*</sup>, С. А. Нерсисян<sup>2,3</sup>, А. Ш. Осепян<sup>3</sup>,  
Д. В. Мальцева<sup>2,4</sup>, Е. Н. Князев<sup>4,\*\*</sup>

Представлено академиком РАН С.И. Колесниковым

Поступило 24.03.2020 г.

После доработки 31.03.2020 г.

Принято к публикации 31.03.2020 г.

Клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека Caco-2 часто используется в качестве модели здорового эпителия кишечника, в том числе в работах по изучению микроРНК. Работа ферментов Drosha и Dicer является неотъемлемой частью процесса образования микроРНК. Неточности в работе этих ферментов приводят к изменению нуклеотидных последовательностей микроРНК с образованием новых изоформ, что в свою очередь может изменять внутриклеточные регуляторные механизмы. В рамках настоящего исследования было показано, что количественные оценки неточностей работы ферментов значимо различаются между образцами нормальной ткани толстой кишки и злокачественных колоректальных опухолей.

**Ключевые слова:** Drosha, Dicer, колоректальный рак, микроРНК, изоформы микроРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738920040216

Клеточные модели кишечного барьера *in vitro* позволяют изучать различные биологические аспекты, включая барьерную, транспортную, секреторную функции эпителия кишечника, взаимодействие с микробиомом и особенности биологии клеток в нормальных и патологических условиях. Использование в качестве моделей человеческих органов иммортализованных опухолевых клеточных линий, например, клеток колоректальной аденокарциномы человека Caco-2

как модели кишечного барьера [1], позволяет получать хорошо воспроизводимые стандартизованные результаты, исключая вклад множества трудно учитываемых факторов, которые имеются в полноценном живом организме, и снижая вариативность, присущую первичным культурам клеток [2]. Добавление внеклеточного матрикса и циркуляции питательной среды в микрофлюидных устройствах дополнительно приближает микроокружение моделей барьера к реальным условиям [3]. Однако при изучении биологических процессов на подобных моделях всегда следует помнить о возможных отличиях опухолевых клеток от нормальных.

В настоящее время активно изучается роль микроРНК в регулировании кишечного барьера. МикроРНК – это короткие молекулы РНК длиной порядка 22 нуклеотидов, играющие ключевую роль в процессе РНК-интерференции [4]. Их важнейшая функция заключается в посттранскрипционном подавлении экспрессии генов-мишеней, происходящем за счет комплементарного связывания микроРНК с 3'-нетранслируемой областью целевой мРНК, приводящего к блокированию дальнейшей трансляции и/или деградации мРНК [5].

Процесс образования микроРНК состоит из нескольких этапов. На первом этапе в результате транскрипции образуется молекула при-мик-

<sup>1</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

<sup>2</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>3</sup> Механико-математический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: mshkurnikov@gmail.com,

\*\*e-mail: knyazevevg@gmail.com

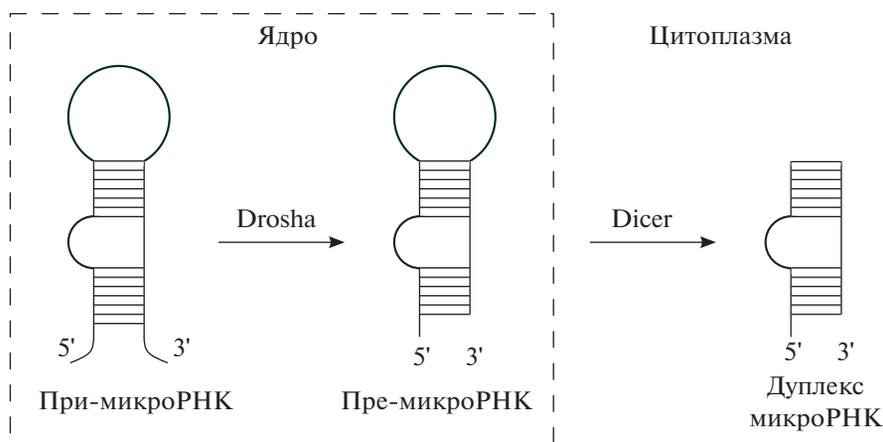


Рис. 1. Этапы созревания микроРНК.

роРНК, имеющая структуру шпильки. На следующем этапе созревания внутриядерный фермент Drosha связывается с при-микроРНК и производит разрезание неспаренных концов молекулы с образованием пре-микроРНК [6]. Наконец, после транспортировки пре-микроРНК в цитоплазму фермент Dicer производит разрезание петли шпильки пре-микроРНК, в результате чего образуется две молекулы микроРНК [7], см. рис. 1. Неточность работы двух указанных ферментов приводит к образованию так называемых изоформ микроРНК (isomiRs) — молекул, отличающихся от канонической микроРНК на 1–3 нуклеотидных основания с концов последовательности [8]. Важность учета этих молекул заключается в том, что зачастую неканоническая изоформа микроРНК может преобладать в клетке [9] и приводить к существенному изменению списка генов-мишеней микроРНК [10, 11].

В настоящем исследовании описанные эффекты были изучены с помощью анализа данных профиля изоформ микроРНК здоровых и опухолевых тканей толстой кишки. Для этого были использованы результаты анализа микроРНК с помощью секвенирования нового поколения в 16 биологических образцах из проекта The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) [12]. Образцы были получены из здоровых тканей и злокачественных опухолей толстой кишки, по два образца у каждого из восьми пациентов. Результаты секвенирования микроРНК были получены в виде таблицы экспрессий изоформ микроРНК, содержащей информацию о количестве ридов, соответствующих каждой изоформе (количества были нормированы на миллион выровненных ридов).

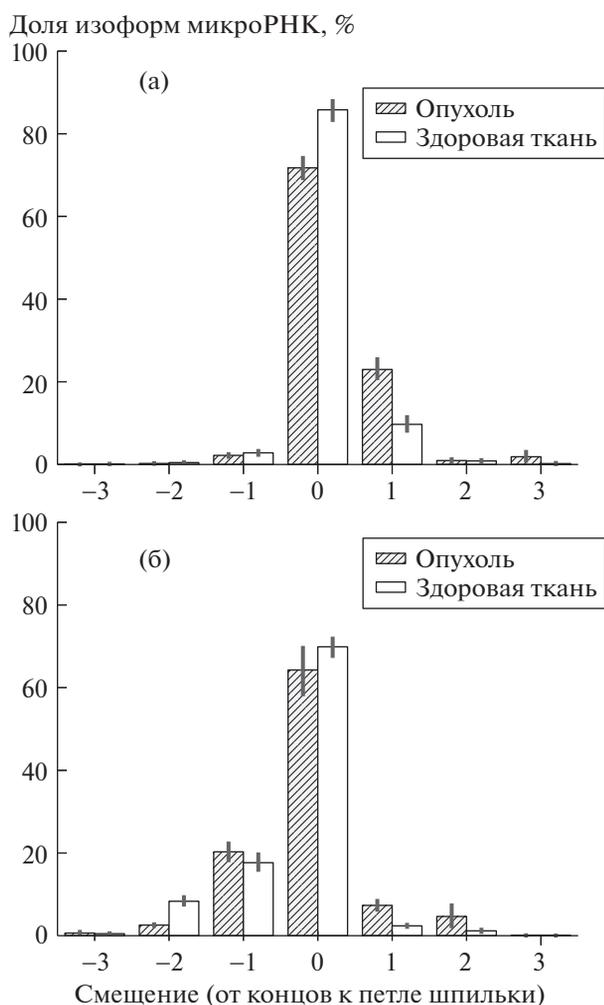
Из анализа были исключены слабо экспрессированные изоформы микроРНК, а именно изоформы, средняя экспрессия которых была мень-

ше 100 ридов на миллион выровненных. Для сравнения профилей экспрессии изоформ микроРНК между здоровыми и патологическими тканями, была проведена агрегативная иерархическая кластеризация образцов методом Варда [13] на основе данных наиболее ярко экспрессированных изоформ (средняя экспрессия больше 1000 ридов на миллион выровненных). Два мажорных кластера образцов оказались полностью согласованными с клинической характеристикой тканей.

Для исследования роли неточностей в работе ферментов Drosha и Dicer в здоровых и опухолевых тканях были составлены таблицы, содержащие информацию о суммарном количестве ридов на миллион выровненных по каждому образцу для каждого значения отступа от канонической формы микроРНК. Отступы с 5'-конца 5'-цепи микроРНК и с 3'-конца 3'-цепи микроРНК были отнесены к неточностям в работе Drosha, тогда как отступы с 3'-конца 5'-цепи и с 5'-конца 3'-цепи были отнесены к неточностям в работе Dicer. Построенные таблицы были разделены на две части, отвечающие за образцы здоровых тканей и за образцы опухолей. Далее значения каждой из таблиц были нормированы с целью приведения к процентной шкале.

Полученные данные отражены на рис. 2а, 2б (значения отступов приведены в направлении от концов к петле шпильки).

Видно, что в целом внутриядерная обработка микроРНК ферментом Drosha проходит с меньшим процентом ошибок по сравнению с цитоплазматической обработкой ферментом Dicer. Также интерес представляет смещение неточностей работы Drosha в сторону петли шпильки на фоне смещенности отступов Dicer в сторону концов шпильки. Таким образом, оба фермента в основном работают на укорачивание молекулы



**Рис. 2.** Количественные оценки неточностей работы в здоровых и опухолевых тканях фермента Drosha (а) и фермента Dicer (б). Вертикальные отрезки на концах столбиков обозначают стандартное отклонение.

микроРНК. Сравнение данных образцов здоровых и опухолевой тканей с помощью U-критерия Манна–Уитни показало, что в патологических клетках происходит существенное изменение частот в вариантах работы Drosha и Dicer. Так, статистически значимыми оказались различия в работе Drosha при значениях смещения 0, 1 и 3 ( $p$ -значения равны  $4.69 \times 10^{-4}$ ,  $4.69 \times 10^{-4}$  и  $2.69 \times 10^{-3}$  соответственно) и в работе Dicer при значениях смещения  $-2$ , 1, 2 ( $p$ -значения равны  $4.69 \times 10^{-4}$ ,  $4.69 \times 10^{-4}$  и  $6.79 \times 10^{-3}$  соответственно).

Таким образом, процесс образования изоформ микроРНК, связанный с деятельностью белков Drosha и Dicer, имеет значимые различия между здоровыми и опухолевыми тканями толстой кишки. Эти данные следует учитывать при исследовании роли микроРНК в регуляции функциональной активности здорового эпителия кишечника,

в том числе везикулярного транспорта [14, 15], с использованием линейных клеток колоректальной аденокарциномы человека. При выборе и разработке методов обнаружения микроРНК, а также при анализе генов-мишеней данных микроРНК и изменения их экспрессии рекомендуется учитывать набор существующих изоформ микроРНК.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70092.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 166. № 1. P. 35–38.
2. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. // Mol. Biol. 2019. V. 53. № 3. P. 411–418.
3. Bein A., Shin W., Jalili-Firoozinezhad S., et al. // Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 2018. V. 5. № 4. P. 659–668.
4. Knyazev E.N., Samatov T.R., Fomicheva K.A., et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 161. № 1. P. 112–115.
5. Skurnikov M.Y., Makarova Y.A., Knyazev E.N., et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 160. № 5. P. 632–634.
6. Lee Y., Ahn C., Han J., et al. // Nature. 2003. V. 425. № 6956. P. 415–419.
7. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., et al. // Science. 2001. V. 293. № 5531. P. 834–838.
8. Morin R.D., O'Connor M.D., Griffith M., et al. // Genome Res. 2008. V. 18. № 4. P. 610–621.
9. Loher P., Londin E.R., Rigoutsos I. // Oncotarget. 2014. V. 5. № 18. P. 8790–8802.
10. Telonis A.G., Loher P., Jing Y., et al. // Nucleic Acids Res. 2015. V. 43. № 19. P. 9158–9175.
11. Mercey O., Popa A., Cavard A., et al. // FEBS Lett. 2017. V. 591. № 5. P. 693–705.
12. Cancer Genome Atlas Network // Nature. 2012. V. 487. № 7407. P. 330–337.
13. Murtagh F., Legendre P. // J. Classif. 2014. V. 31. № 3. P. 274–295.
14. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., et al. // Histochem. Cell Biol. 2004. V. 121. № 6. P. 429–439.
15. Samatov T.R., Shkurnikov M.U., Tonevitskaya S.A., et al. // Prog. Histochem. Cytochem. 2015. V. 49. № 4. P. 21–29.

## DIFFERENCES IN THE DROSHA AND DICER CLEAVAGE PROFILES IN COLORECTAL CANCER AND NORMAL COLON TISSUE SAMPLES

M. Yu. Shkurnikov<sup>a,#</sup>, S. A. Nersisyan<sup>b,c</sup>, A. Sh. Osepyan<sup>c</sup>,  
D. V. Maltseva<sup>b,d</sup>, and E. N. Knyazev<sup>d,##</sup>

<sup>a</sup> P. A. Hertsen Moscow Oncology Research Center— branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Faculty of Mechanics and Mathematics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: mshkurnikov@gmail.com

<sup>#</sup>e-mail: knyazevevg@gmail.com

Presented by Academician of the RAS S. I. Kolesnikov

**Abstract**— The cell line of human colorectal adenocarcinoma Caco-2 is often used as a model of healthy intestinal epithelium in microRNA studies. The work of the enzymes Drosha and Dicer is an integral part of the process of miRNA formation. Inaccuracies in the work of these enzymes lead to a change in the nucleotide sequences of miRNAs with the formation of new isoforms, which in turn can change intracellular regulatory mechanisms. In the framework of this study, it was shown that quantitative estimates of inaccuracies in Drosha and Dicer activity significantly differ between samples of normal colon tissue and malignant colorectal tumors.

**Keywords:** Drosha, Dicer, colorectal cancer, miRNA, microRNA, microRNA isoform, miRNA isoforms