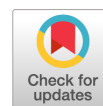


ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *FOXO1*, *FOXO3* И *BECN1* В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ТЕЧЕНИИ САРКОИДОЗА ЛЕГКИХ



И.Е. Малышева¹, О.В. Балан¹, Э.Л. Тихонович²

¹ Институт биологии — обособленное подразделение ФГБУН Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», г. Петрозаводск, Россия

² Республиканская больница им. В.А. Баранова, г. Петрозаводск, Россия

Резюме. Среди семейства белков FOXO (Forkhead box O), которые наиболее исследованы и широко представлены в различных органах и тканях человека, выделяют транскрипционные факторы FOXO1 и FOXO3. Многочисленные исследования свидетельствуют о важной роли этих белков в поддержании метаболизма и гомеостаза клеток, а также в патогенезе различных патологических состояний. Вовлечение FOXO-сигнального пути в патогенез саркоидоза легких подтверждается и результатами секвенирования РНК. Активация FOXO связана с регуляцией процессов аутофагии, нарушение которых отмечается при саркоидозе легких. Это системное иммуновоспалительное заболевание неустановленной этиологии, характерным признаком которого является образование эпителиоидноклеточных гранул в различных органах, преимущественно в легких. Цель настоящего исследования заключалась в изучении экспрессии генов FOXO1, FOXO3 и BECN1 в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания в сравнении с условно здоровыми донорами (контроль). Показано, что экспрессия генов транскрипционных факторов FOXO1 и FOXO3 значимо выше в лейкоцитах периферической крови (ЛПК) больных саркоидозом легких II стадии, при хроническом течении заболевания (стабилизация состояния), в отсутствии терапии по сравнению с контролем ($p < 0,01$ и $p < 0,001$). Содержание мРНК гена *BECN1* в лейкоцитах периферической крови больных с хроническим течением саркоидоза легких также выше по сравнению с условно здоровыми донорами. По результатам корреляционного анализа выявлена тесная положительная связь между экспрессией генов *FOXO1*, *FOXO3* и *BECN1*. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена составили 0,69 (*FOXO1/BECN1*) и 0,61 (*FOXO3/BECN1*) ($p = 0,0002$ и $p = 0,0016$ соответственно). Таким образом, у больных саркоидозом легких II стадии, без терапии, активация FOXO1/3 вероятно связана с усилением экспрессии гена *BECN1*, кодирующего белок аутофагии BECLIN1 (ATG6). В настоящее время установлены многочисленные молекулярно-генетические маркеры, которые вносят вклад в риск развития саркоидоза легких. Изучение молекулярных механизмов этого системного воспалительного заболевания имеет важное значение для более полного понимания патогенеза болезни. Это не только позволяет понять клиническую симптоматику, но также прогно-

Адрес для переписки:

Малышева Ирина Евгеньевна
185910, Россия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, 11,
Институт биологии — обособленное подразделение
ФГБУН ФИЦ «Карельский научный центр» РАН.
Тел.: 8 (8142) 57-31-07. Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Contacts:

Irina E. Malysheva
185910, Russian Federation, Petrozavodsk, Pushkinskaya str., 11,
Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the RAS.
Phone: +7 (8142) 57-31-07. Fax: +7 (8142) 76-98-10.
E-mail: i.e.malysheva@yandex.ru

Для цитирования:

Малышева И.Е., Балан О.В., Тихонович Э.Л. Экспрессия генов FOXO1, FOXO3 и BECN1 в лейкоцитах периферической крови при хроническом течении саркоидоза легких // Инфекция и иммунитет. 2025. Т. 15, № 3. С. 582–586. doi: 10.15789/2220-7619-IOF-17856

Citation:

Malysheva I.E., Balan O.V., Tikhonovich E.L. Expression of FOXO1, FOXO3 and BECN1 genes in peripheral blood leukocytes in chronic course of pulmonary sarcoidosis // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2025, vol. 15, no. 3, pp. 582–586. doi: 10.15789/2220-7619-IOF-17856

Финансовое обеспечение исследований осуществлялось из средств федерального бюджета на выполнение государственного задания Карельского научного центра Российской академии наук (тема FMEN-2022-0009).

Financial support of the research was provided from the federal budget funds for the state assignment of the Karelian Research Center of the Russian Academy of Sciences (topic FMEN-2022-0009).

зировать исход заболевания. Кроме того, расширение знаний о патогенезе способствует разработке более целенаправленных, эффективных и безопасных методов лечения саркоидоза легких с учетом индивидуальных особенностей состояния здоровья каждого пациента.

Ключевые слова: саркоидоз легких, воспаление, транскрипционные факторы FOXO, аутофагия, экспрессия генов, FOXO1, FOXO3, BECN1.

EXPRESSION OF FOXO1, FOXO3 AND BECN1 GENES IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES IN CHRONIC COURSE OF PULMONARY SARCOIDOSIS

Malysheva I.E.^a, Balan O.V.^a, Tikhonovich E.L.^b

^a Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

^b V.A. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. Among the FOXO (Forkhead box O) family proteins, which are the most studied and widely represented in various human organs and tissues, transcription factors FOXO1 and FOXO3 are of special importance. Numerous studies evidence about their crucial role in maintaining cell metabolism and homeostasis, as well as in the pathogenesis of various pathological conditions. The involvement of the FOXO-signaling pathway in the pathogenesis of pulmonary sarcoidosis is also confirmed by RNA sequencing data. FOXO activation is related to the regulation of autophagy processes, the disruption of which is noted in pulmonary sarcoidosis, a systemic immunoinflammatory disease of unknown etiology, characterized by the formation of epithelioid cell granulomas in various organs, primarily in the lungs. The study was aimed at investigating expression of FOXO1, FOXO3 and BECN1 genes in peripheral blood leukocytes from patients with chronic pulmonary sarcoidosis compared with apparently healthy donors (control). It is shown that the expression of transcription factors FOXO1 and FOXO3 genes is significantly higher in peripheral blood leukocytes (PBL) from patients with pulmonary sarcoidosis stage II, with chronic course (stabilization of the condition), in the absence of therapy compared to the control ($p < 0.01$ and $p < 0.001$). The PBL *BECN1* gene mRNA level from patients with chronic pulmonary sarcoidosis is also higher compared to control group. Correlation analysis revealed a close positive relation between the expression of *FOXO1*, *FOXO3* and *BECN1* genes, with Spearman rank correlation coefficients comprising 0.69 (*FOXO1/BECN1*) and 0.61 (*FOXO3/BECN1*) ($p = 0.0002$ and $p = 0.0016$, respectively). Thus, in stage II pulmonary sarcoidosis patients without therapy, FOXO1/3 activation is likely associated with upregulated *BECN1* gene expression encoding the autophagy protein BECLIN1 (ATG6). Numerous molecular genetic markers that contribute to the risk of pulmonary sarcoidosis have been identified. Studying the underlying molecular mechanisms is essential to better understand the disease pathogenesis not only allowing to gain insight into the clinical symptomatology but also to predict the disease outcome. In addition, increased knowledge on pathogenesis contributes to developing more targeted, effective and safe treatment methods for pulmonary sarcoidosis, taking into account individual characteristics of each patient's health status.

Key words: pulmonary sarcoidosis, inflammation, FOXO transcription factors, autophagy, FOXO1, FOXO3, BECN1, gene expression.

Введение

Транскрипционные факторы семейства Forkhead box O (FOXO) принимают участие в контроле широкого спектра клеточных процессов. Это эволюционно-консервативные белки, являющиеся ключевыми компонентами множества сигнальных путей в клетке. Они принимают участие в активации/ингибировании транскрипции нижестоящих генов-мишеней, играя важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза, роста и старения клеток и других внутриклеточных процессов [3, 14]. Белки FOXO локализуются в ядре клетки (активируют транскрипцию генов-мишеней) и перемещаются в цитоплазму под действие регуляторных механизмов [7, 9]. Их активность регулируется посттрансляционными модификациями, включая фосфорилирование, ацетилирование и убиквитинирование [14]. Показано, что белки FoxO участвуют в поддержании иммунного гомеостаза и регуляции иммунных реакций. Они

играют важную роль в развитии и функционировании регуляторных Т-клеток, регуляции развития и созревания Т- и В-лимфоцитов, а также других лейкоцитов [12]. Среди белков семейства FoxO, наиболее изучены и широко экспрессируются в различных органах и тканях человека белки FOXO1 и FOXO3 [14]. Показана их значимая роль в регуляции воспалительного ответа. Указанные белки способствуют повышению экспрессии генов провоспалительных цитокинов, Toll-подобных рецепторов [14].

В настоящее время установлено, что транскрипционные факторы FOXO вовлечены в патогенез многих заболеваний, в том числе саркоидоза (болезнь Бенье–Бека–Шаумана). Это системное иммунновоспалительное заболевание неустановленной этиологии, характеризующееся образованием эпителиоидно-клеточных гранул в различных органах, преимущественно в легких. Результаты эпидемиологических исследований и использование мышиных моделей гранулематозного заболевания свидетельствуют

о значимой роли инфекционных агентов (микобактерии, пропионобактерии) в этиологии саркоидоза легких [1, 4]. В работе Чжао и соавт. отмечено, что сигнальный путь FOXO вовлечен в патогенез данного заболевания [15]. По данным литературы, транскрипционные факторы FOXO участвуют в регуляции и дисрегуляции аутофагии [15]. Этот процесс имеет важное значение для поддержания клеточного гомеостаза, посредством удаления из клеток поврежденных органелл, агрегированных белков, внутриклеточных патогенов [2, 6]. Транскрипционные факторы FOXO (в частности, FOXO1 и FOXO3) хорошо известны как важнейшие индукторы аутофагии. Активация FOXO связана с повышением экспрессии генов аутофагии, что также регулируется белком аутофагии BECLIN 1 (Atg6). BECLIN 1 связывается с макромолекулярным комплексом, который активирует аутофагию. По данным литературы, нарушение процесса аутофагии имеет место при саркоидозе [2]. Цель настоящего исследования заключалась в изучении экспрессии генов *FOXO1*, *FOXO3* и *BECLN1* в ЛПК крови больных саркоидозом легких с хроническим течением заболевания и у здоровых людей.

Материалы и методы

Обследовано 44 человека (20 больных с хроническим течением саркоидоза легких, II стадия заболевания (средний возраст — $42,11 \pm 2,21$)) и 24 человека из группы контроля (условно здоровые доноры) (средний возраст — $43,03 \pm 1,84$).

Диагноз саркоидоз легких установлен в соответствии с критериями на основе клинко-рентгенологических и лабораторных изменений. Саркоидоз у всех пациентов (100%) был верифицирован гистологически на основании исследования биоптата. Больные саркоидозом легких со стабильным течением, при отсутствии активности данного заболевания находились без терапии и не получали других видов лечения на момент проведения исследования. От всех пациентов было получено информированное согласие до проведения исследований. Критерии исключения из исследования: наличие сахарного диабета, выраженные нарушения функции внутренних органов, а также перенесенные в последний месяц инфекционные заболевания, курение табака, беременность и лактация, алкогольная зависимость, индекс массы тела ≥ 30 кг/м. Работа была выполнена с соблюдением этических норм согласно критериям Всемирной ассоциации медицинских редакторов (The World Association of Medical Editors — WAME) и одобрено локальным этическим комитетом ГБУЗ «Республиканская больница им. В.А. Баранова» г. Петрозаводска, протокол № 165 от 02.11.2023 г. Пробы периферической крови использовали в качестве материала для исследования.

Из лейкоцитов крови выделяли тотальную РНК, с помощью реагента для выделения РНК PureZol (Bio-Rad). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора «MMLV RT kit» (Евроген, Россия). Уровень транскриптов генов *FOXO1*, *FOXO3*, *BECN1* в ЛПК оценивали с помощью

Таблица. Нуклеотидная последовательность праймеров для ПЦР-РВ

Table. Nucleotide sequence of primers for RT-PCR

Ген (№ в NCBI) Gene (No. in NCBI)	Праймер Primer	Последовательность праймера 5'→3' Primer sequence 5'→3'	Источник Source
18sRNA (NR_145819.1)	Прямой Forward	agaaacggctaccacatcca	Pinto et al., 2010
	Обратный Reverse	caccagacttgccctcca	
RPL19 (NM_000981.4)	Прямой Forward	aatcgccaatgccaaactc	Собственный дизайн Own design
	Обратный Reverse	ccttcgcttacctatgc	
FOXO1 (NM_002015.4)	Прямой Forward	aacagccaccactctatcatc	Собственный дизайн Own design
	Обратный Reverse	gcaccaagttcagttacatacc	
FOXO3 (NM_001455.4)	Прямой Forward	tgagtgaaggcaatagcatac	Собственный дизайн Own design
	Обратный Reverse	agcacctatacagcaccataac	
BECN1 (NM_004849.4)	Прямой Forward	gctgccgttatactgttctgg	Собственный дизайн Own design
	Обратный Reverse	cctcctgtgtcttcaatcttgc	

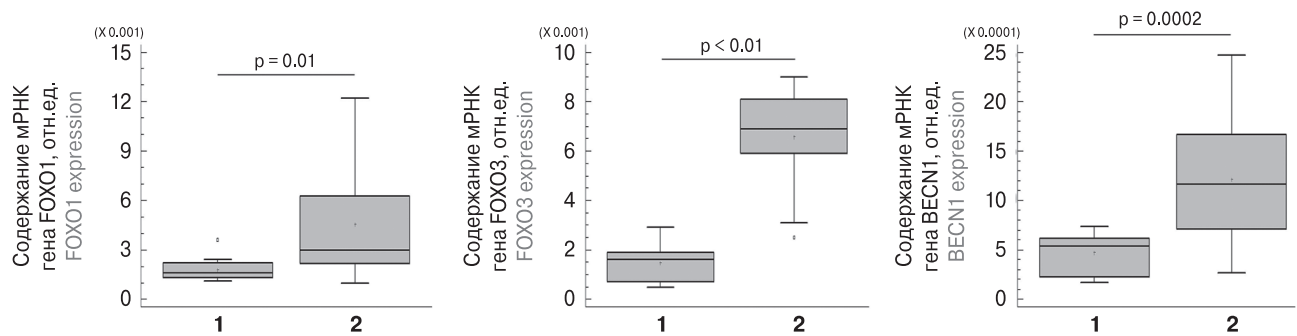


Рисунок. Уровень транскриптов генов *FOXO1*, *FOXO3* и *BECN1* в лейкоцитах периферической крови пациентов с хроническим течением саркоидоза легких (2) и в контрольной группе (1)

Figure. *FOXO1*, *FOXO3* and *BECN1* gene expression in peripheral blood leukocytes of patients with chronic pulmonary sarcoidosis (2) and in controls (1)

полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), используя наборы «qPCRmix-HS SYBR» (Евроген, Россия). Гены *18sRNA* и *RPL19* были выбраны в качестве референсных. Для каждого образца ПЦР-РВ проводили не менее трех раз. Конструирование праймеров осуществляли в программе Veason Designer 5.0. Нуклеотидная последовательность праймеров представлена в табл.

Статистическая обработка данных проведена в программе StatGraphics Centurion XVI версия 16.1.11. Достоверность различий уровня транскриптов гена между группами оценивали с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

Представителей семейства FOXO объединяет наличие в структуре белков высококонсервативного ДНК-связывающего домена Forkhead (ФКН). В его составе есть уникальная вставка из пяти аминокислотных остатков, что делает их более дивергентной группой белков семейства Fox [10]. FoxO являются нижестоящими мишенями сигнального пути фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)/Akt и играют важную роль в регуляции клеточного цикла, включая пролиферацию, рост, апоптоз, экспрессию белков-антиоксидантов и белков аутофагии [5]. Согласно результатам исследований, в ЛПК пациентов с хроническим течением саркоидоза легких, без терапии, значимо повышена экспрессия мРНК генов транскрипционных факторов FOXO1 и FOXO3 по сравнению с контролем ($p < 0,01$ и $p < 0,001$) (рис.).

По данным литературы, FOXO3 может действовать на свой собственный промотор, промотор гена *FOXO1*, а также связываться с промоторами генов аутофагии, индуцируя их экспрессию. При этом отмечается транслокация FOXO3 из цитоплазмы в ядро клетки [5]. Согласно полученным нами данным, в лейкоцитах периферической крови больных саркоидозом легких отмечено достоверное повышение уровня транскриптов гена *BECN1* по сравнению с контролем, $p = 0,0002$ (рис.). По результатам корреляционного анализа выявлена тесная положительная связь между экспрессией генов *FOXO1*, *FOXO3* и *BECN1*. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена составили 0,69 (*FOXO1/BECN1*) и 0,61 (*FOXO3/BECN1*) ($p = 0,0002$ и $p = 0,0016$, соответственно). Активация FOXO1/FOXO3, вероятно, связана с усилением экспрессии гена *BECN1* (ATG6), который является важным регулятором процессов аутофагии. *BECN1* взаимодействует с ATG14L и фосфатидилинозитол-3-фосфат-киназами Vps34 и Vps15, образуя белковый комплекс, который индуцирует образование фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P), участвуя в мембране зарождающегося фагофора [8, 11].

Таким образом, по результатам исследований, у больных саркоидозом легких II стадии, при хроническом течении заболевания (стабилизация состояния, без терапии), в лейкоцитах периферической крови значимо повышена экспрессия генов транскрипционных факторов FOXO и аутофагии.

Заключение

В настоящее время установлены многочисленные молекулярно-генетические маркеры, которые вносят вклад в развитие саркоидоза легких. Более полное понимание патогенеза данного заболевания, имеет важное значение для разработки более эффективных и безопасных методов лечения.

Список литературы/References

1. Визель А.А., Гурылева М.Э. Потенциальные инфекционные триггеры при саркоидозе // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002. Т. 4, № 4. С. 313–324. [Vizel A.A., Gurileva M.E. Potential Infectious Triggers in Sarcoidosis. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* = *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, vol. 4, no. 4, pp. 313–324. (In Russ.)]
2. Adouli J., Fried A., Swier R., Ghio A., Petrache I., Tilley S. Cellular Recycling Gone Wrong: The Role of Dysregulated Autophagy and Hyperactive mTORC1 in the Pathogenesis of Sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.*, 2023, vol. 40, no. 2: e2023016. doi: 10.36141/svld.v40i2.13498
3. Carter M.E., Brunet A. FOXO transcription factors. *Curr. Biol.*, 2007, vol. 17, no. 4, pp. R113–R114. doi: 10.1016/j.cub.2007.01.008
4. Chen E., Moller D. Etiologies of Sarcoidosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 2015, vol. 49, no. 1, pp. 6–18. doi: 10.1007/s12016-015-8481-z
5. Cheng Z. The FoxO-Autophagy Axis in Health and Disease. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2019, vol. 30, no. 9, pp. 658–671. doi: 10.1016/j.tem.2019.07.009
6. Deretic V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism. *Immunity.*, 2021, vol. 54, no. 3, pp. 437–453. doi: 10.1016/j.immuni.2021.01.018
7. Guo X., Peng K., He Y., Xue L. Mechanistic regulation of FOXO transcription factors in the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer*, 2024, vol. 1879, no. 2: 189083. doi: 10.1016/j.bbcan.2024.189083
8. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 571–580. doi: 10.1038/cdd.2010.191
9. Lasick K.A., Jose E., Samayoa A.M., Shanks L., Pond K.W., Thorne C.A., Paek A.L. FOXO nuclear shuttling dynamics are stimulus-dependent and correspond with cell fate. *Mol. Biol. Cell.*, 2023, vol. 34, no. 3: ar21. doi: 10.1091/mbc.E22-05-0193
10. Obsil T., Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene.*, 2008, vol. 27, no. 16, pp. 2263–2275. doi: 10.1038/onc.2008.20
11. Ohashi Y. Activation Mechanisms of the VPS34 Complexes. *Cells.*, 2021, vol. 10, no. 11: 3124. doi: 10.3390/cells10113124
12. Peng S.L. Forkhead transcription factors in chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010, vol. 42, no. 4, pp. 482–485. doi: 10.1016/j.biocel.2009.10.013
13. Pinto J., Dias V., Zoller H., Porto G., Carmo H., Carvalho F., de Sousa M. Hepcidin messenger RNA expression in human lymphocytes. *Immunology.*, 2010, vol. 130, no. 2, pp. 217–230. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03226.x
14. Wang Y., Zhou Y., Graves D.T. FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation. *Biomed. Res. Int.*, 2014, vol. 2014: 925350. doi: 10.1155/2014/925350
15. Zhao M., Tian C., Di X., Cong S., Cao Y., Zhou X., Wang K. Systematic and Comprehensive Analysis of tRNA-Derived Small RNAs Reveals Their Potential Regulatory Roles and Clinical Relevance in Sarcoidosis. *J. Inflamm. Res.*, 2023, vol. 16, no. 1, pp. 2357–2374. doi: 10.2147/JIR.S406484

Авторы:

Малышева И.Е., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики Института биологии — обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ Карельский научный центр РАН, г. Петрозаводск, Россия;

Балан О.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генетики Института биологии — обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ Карельский научный центр РАН, г. Петрозаводск, Россия;

Тихонович Э.Л., к.м.н., зав. отделением респираторной терапии Республиканской больницы им. В.А. Баранова, г. Петрозаводск, Россия.

Authors:

Malysheva I.E., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetics, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation;

Balan O.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Genetics, Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation;

Tikhonovich E.L., PhD (Medicine), Head of the Respiratory Therapy Department, V.A. Baranov Republican Hospital, Petrozavodsk, Russian Federation.

Поступила в редакцию 28.01.2025
Принята к печати 18.05.2025

Received 28.01.2025
Accepted 18.05.2025