

ГИПОКСИЯ УСИЛИВАЕТ ТРАНСЦИТОЗ В ЭНТЕРОЦИТАХ КИШЕЧНИКА

Д. В. Мальцева¹✉, М. Ю. Шкурников^{1,2}, С. А. Нерсисян¹, С. В. Никулин¹, А. А. Курносов¹, М. П. Райгородская³, А. И. Осипьянц^{2,4}, Е. А. Тоневский⁵

¹ Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

² Онкологический институт имени П. А. Герцена (филиал Национального медицинского исследовательского центра радиологии), Москва, Россия

³ Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, Россия

⁴ Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

⁵ Фонд развития инновационного научно-технологического центра «Долина Менделеева», Москва, Россия

Важнейшее условие нормального функционирования кишечника — сохранение барьерных функций монослоя эпителиальных клеток, выстилающих его поверхность. Воспалительные состояния кишечника, как правило, ассоциированы с дополнительной тканевой гипоксией, что приводит к нарушению целостности эпителия. Однако опасность инфекционных заболеваний может сохраняться и при отсутствии очевидных нарушений монослоя клеток. Возможная причина этого — изменение внутриклеточного транспорта везикул, содержащих бактерии. Целью работы было на модели энтероцитов кишечника человека исследовать влияние гипоксии на процесс транскитоza. Показано, что гипоксия усиливает в 1,8 раза транскитоz модельного белка, растительного лектина рицина. Сравнительное исследование транскриптомов и протеомов выявило достоверное изменение экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный везикулярный транспорт, в том числе падение экспрессии регулятора метаболизма липидов apoB, как на уровне белка (в 6,5 раза), так и на уровне мРНК (в 2,1 раза). Необходимы работы по изучению возможного механизма регуляции экспрессии генов в энтероцитах кишечника в условиях гипоксии.

Ключевые слова: гипоксия, энтероцит, эпителий кишечника, микроРНК, мРНК, протеом, транскриптом, транскитоz, Caco-2

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60519X0184).

Благодарности: авторы благодарят Центр коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ) за возможность использования оборудования.

Вклад авторов: Д. В. Мальцева — молекулярно-биологические исследования, анализ данных, написание статьи; М. Ю. Шкурников — обработка данных транскриптома, секвенирования, статистический анализ; С. А. Нерсисян — обработка данных секвенирования, биоинформатический анализ, функциональный анализ генов; С. В. Никулин — работа с культурой клеток, подготовка образцов для анализа протеома, обработка данных протеома; А. А. Курносов — подготовка образцов для секвенирования микроРНК, анализ данных; М. П. Райгородская — анализ экспрессии генов методом ПЦР-РВ, транскриптомный анализ; А. И. Осипьянц — культуральная работа, подготовка образцов для анализа протеома и транскриптома; Е. А. Тоневский — организация исследования, анализ данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: все образцы для исследования были получены с соблюдением принципов и правил Хельсинской декларации.

✉ **Для корреспонденции:** Диана Васильевна Мальцева
ул. Вавилова, д. 7, г. Москва, 117321; dmaltseva@gmail.com

Статья получена: 08.08.2020 **Статья принята к печати:** 21.08.2020 **Опубликована онлайн:** 28.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.049

HYPOXIA ENHANCES TRANSCYTOSIS IN INTESTINAL ENTEROCYTES

Maltseva DV¹✉, Shkurnikov MYu^{1,2}, Nersisyan SA¹, Nikulin SV¹, Kurnosov AA¹, Raigorodskaya MP³, Osipyants AI^{2,4}, Tonevitsky EA⁵

¹ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

² Hertsen Moscow Oncology Research Center, Moscow, Russia

³ SRC Bioclinicum, Moscow, Russia

⁴ Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

⁵ Fund for Development of Innovative Scientific-Technological Center Mendeleev Valley, Moscow, Russia

The integrity of the intestinal epithelial cell lining is crucial for the normal intestinal function. As a rule, intestinal inflammation is associated with additional tissue hypoxia, leading to the loss of epithelial monolayer integrity. However, in the absence of visible damage to the epithelium, there still might be a risk of infection driven by changes in the intracellular transport of bacteria-containing vesicles. The aim of this study was to investigate the effects of hypoxia on transcytosis using a human intestinal enterocyte model. We found that hypoxia enhances transcytosis of the model protein ricin 1.8-fold. The comparative transcriptome and proteome analyses revealed significant changes in the expression of genes involved in intracellular vesicle transport. Specifically, the expression of apoB (the regulator of lipid metabolism) was changed at both protein (6.5-fold) and mRNA (2.1-fold) levels. Further research is needed into the possible mechanism regulating gene expression in intestinal erythrocytes under hypoxic conditions.

Keywords: hypoxia, enterocyte, intestinal epithelium, microRNA, mRNA, proteome, transcriptome, transcytosis, Caco-2

Funding: the study received public financial support from the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project ID RFMEFI60519X0184).

Acknowledgement: the authors thank the Human Proteome Core Facility (Institute of Biomedical Chemistry) for permission to use the Facility's equipment

Author contribution: Maltseva DV — molecular tests, analysis of their results, manuscript preparation; Shkurnikov MYu — analysis of transcriptome and sequencing data, statistical analysis; Nersisyan SA — sequencing data processing, bioinformatic analysis, functional gene analysis; Nikulin SV — cell culture, sample preparation for subsequent proteome analysis, proteomic data analysis; Kurnosov AA — sample preparation for microRNA sequencing, analysis of sequencing data; Raigorodskaya MP — real-time PCR-based analysis of gene expression, transcriptome analysis; Osipyants AI — cell culture, sample preparation for subsequent proteome and transcriptome analyses; Tonevitsky EA — supervision, data analysis, manuscript preparation.

Compliance with ethical standards: the samples were obtained following the principles of the Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Diana V. Maltseva
Vavilova, 7, Moscow, 117321; dmaltseva@gmail.com

Received: 08.08.2020 **Accepted:** 21.08.2020 **Published online:** 28.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.049

Среди основных функций эпителия кишечника — защита организма от инфекций и обеспечение возможности безопасного существования комменсальных бактерий в кишечнике [1, 2]. Бактерии и бактериальные антигены могут непосредственно взаимодействовать с клетками эпителия кишечника, в том числе с энтероцитами [2, 3]. Такое взаимодействие включает следующие основные этапы: связывание с поверхностью клетки, эндоцитоз, экзоцитоз и транцитоз бактерий, их фрагментов и белков [3]. Рецепторами для бактерий на поверхности энтероцитов служат как белки, так и гликолипиды и углеводы [4]. Бактериальную адгезию к тканям кишечного барьера моделируют с помощью различных клеточных линий [5]. Из клеточных линий наиболее часто в качестве модели используют клетки аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2 [6–8]. В просвете здорового кишечника в ходе метаболизма комменсальных бактерий возникают условия гипоксии [5]. Низкий уровень кислорода стабилизирует индуцируемые гипоксией факторы HIF1 α и HIF2 α , которые, в свою очередь, влияют на барьерные функции кишечного эпителия [9]. Многие паталогические состояния кишечника также ассоциированы с развитием гипоксии [10]. Это подтверждает важность исследования всех этапов взаимодействия кишечной микробиоты с эпителием при недостатке кислорода.

Растительные лектины — хорошо описанные белки, которые используют для изучения связывания белковых молекул с поверхностью клетки и процессов внутриклеточного транспорта [11, 12]. Рецепторами таких белков на поверхности клетки служат гликозилированные белки и липиды, что позволяет использовать лектины в качестве моделей при изучении взаимодействия бактерий с клетками. Целью настоящей работы было исследовать влияние гипоксии на процесс транцитоза в клетках эпителия кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Линию иммортализованных клеток аденокарциномы ободочной кишки Caco-2 (Институт цитологии РАН; Санкт-Петербург) культивировали в среде MEM (Gibco; США) с добавлением 20%-й фетальной сыворотки крупного рогатого скота FBS (Gibco; США), 1%-го (v/v) раствора заменимых аминокислот (Gibco; США), пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) (Gibco; США). Клетки Caco-2 культивировали в шестилуночных планшетах (Corning; США) в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену среды производили каждые 2–3 суток. Для индукции гипоксии в среду добавляли CoCl₂ (Sigma-Aldrich; США) до концентрации 300 мМ и инкубировали 24 ч. Затем клетки промывали однократным (1 \times) DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома и протеома, как было описано ранее [13, 14].

Оценку влияния гипоксии на состояние монослоя клеток проводили с помощью импедансной спектроскопии. Для этого перед посевом клеток Caco-2 в 96-луночные планшеты с мембранными вставками (Corning; США) все лунки планшета заполняли средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂. Затем клетки Caco-2 рассеивали приблизительно по 5600 клеток на каждую мембранную вставку в объеме 50 мкл и культивировали в течение 23 суток до достижения состояния дифференцированных энтероцитов. Смену

среды производили каждые 2–3 суток. Для индукции гипоксии в среду добавляли CoCl₂, как описано выше.

Измерение импедансных спектров проводили в диапазоне частот от 40 до 20 000 Гц при помощи системы импедансной спектроскопии («БиоКлиникум»; Россия) и электрода STX100C96 (World Precision Instruments; США) при комнатной температуре [15]. Для получения средних значений электрических параметров использовали три независимые мембранные вставки с клетками. Обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с графической оболочкой (R-Tools Technology; США)

Растительный лектин рицин выделяли из семян клещевины *Ricinus communis*, как описано ранее [16, 17]. Биотинилирование, анализ связывания с асиалофетуином и проверку цитотоксических свойств на клетках-мишенях проводили, как описано ранее [18–20].

Для оценки транцитоза дифференцированные клетки Caco-2 инкубировали со средой, содержащей биотинилированный рицин (1 \times 10⁻⁷ М), в мембранных вставках. Белок добавляли в верхнюю камеру лунки на апикальную мембрану клеток. Для иммуноферментного анализа культуральную среду забирали из нижней камеры лунки через 1 и 6 ч.

Иммуноферментный анализ для определения концентрации лектина в культуральной среде проводили следующим образом. Моноклональные антитела RA999 против каталитической субъединицы рицина (10 мкг/мл в 10 мМ фосфатном буфере (ФБ) pH 7,4 (Sigma-Aldrich; Германия) адсорбировали на 96-луночную планшетку (Corning; США) по 100 мкл на лунку. Для отмывания использовали буфер ФБ, содержащий 0,05% Tween-20 (буфер ФБТ). В качестве неспецифического белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА) («Диаэм»; Россия). Для блокирования неспецифических мест связывания использовали буфер ФБТ, содержащий 0,1% БСА. Культуральные среды разводили в 100 раз буфером ФБ, содержащим 50 мМ β -лактозы (Sigma-Aldrich; Германия) и наносили по 100 мкл в лунки планшетки с иммобилизованными антителами. Все инкубации проводили при +37 °С в термощейкере. Биотинилированный лектин детектировали конъюгатом стрептовидина с пероксидазой хрена (Intitrogen; Германия). После инкубации с жидким субстратом 3,3',5,5'-тетраметилбензидином (Intitrogen; Германия) реакцию останавливали 1М раствором HCl и измеряли оптическую плотность при 450 нм на планшетном спектрофлуориметре SpectroMax i3x (Molecular devices; США). Моноклональные антитела были любезно предоставлены профессором П. Г. Свешниковым (лаборатория биотехнологии, Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения; Россия).

Анализ экспрессии генов методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили так же, как описано ранее [14]. В качестве референсных использовали транскрипты генов *ACTB* и *GAPDH*.

Профиль экспрессии мРНК анализировали с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [14]. Значение RIN для всех использованных образцов было выше 9,5. Для синтеза кДНК брали 500 нг выделенной тотальной РНК. Все стадии подготовки образцов, гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили так же, как описано ранее [21]. CEL-файлы, полученные при сканировании

микрочипов, обрабатывали с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Неаннотированные пробсыеты (наборы проб на микрочипе) исключали из анализа. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе выбирали значение 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix.

Профиль экспрессии микроРНК анализировали с помощью секвенирования «нового поколения» (NGS). Библиотеки NGS создавали из фракции малых РНК, полученной с использованием набора CATS small RNA-seq в соответствии с протоколом производителя (Diagenode; Бельгия). После ПЦР-амплификации библиотеки очищали с использованием магнитных шариков AMPure. Концентрации конечных библиотек измеряли с помощью набора Qubit v2.0 DNA High Sensitivity DNA Kit (ThermoFisher Scientific; США). Затем объединенные библиотеки денатурировали и группировали на шести считывающих проточных ячейках Illumina HiSeq2000 V4 (Illumina; США) и секвенировали. Проводили 51 цикл глубокого секвенирования с шестицикловым индексированием ридов. Данные секвенирования HiSeq 2000 экспортировали в виде файла FASTQ, полученные риды подвергали обрезке адаптеров и удалению поли-(A)-хвоста.

Контроль качества FASTQ файлов секвенирования микроРНК осуществляли с помощью программы FastQC версии v0.11.9 (Babraham Bioinformatics; Великобритания). Cutadapt версии 2.8 использовали для обрезки адаптеров [22], риды короче 18 нуклеотидов удаляли. Экспрессию микроРНК оценивали с помощью программы miRDeep2 [23]. Анализ дифференциальной экспрессии проводили на языке R версии 3.6.3 (R-Tools Technology; США) с использованием библиотеки DESeq2 [24].

Статистическую обработку данных микрочипов осуществляли следующим образом. Исходные данные нормировали с использованием пакета oligo для языка программирования R (R-Tools Technology; США). Полученные данные логарифмировали по основанию 2. Анализ дифференциальной экспрессии генов и микроРНК проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Поправку на множественную проверку гипотез делали с помощью метода False Discovery Rate (FDR) и процедуры Бенджамини-Хохберга.

Функциональную аннотацию генов производили с помощью баз данных и алгоритмов DAVID версии 6.8 (Laboratory of Human Retrovirology and Immunoinformatics; США). Валидированные взаимодействия микроРНК и генов-мишеней были экспортированы из базы данных DIANA-TarBase версии 8 (DIANA Lab; Греция) [25]. Предсказание позиций связывания микроРНК на 3'-нетранслируемых областях мРНК-мишеней производили с помощью miRWalk [26]. Для поиска интронных микроРНК и их генов-хозяев использовали базу данных miRIAD.

Подготовку лизатов клеток линии Caco-2, экстракцию тотального белка, гидролитическое расщепление и последующие процедуры для анализа протеомов проводили, как описано ранее [14]. После трипсинолиза надосадочную жидкость анализировали на масс-спектрометре Q-Exactive HF-X в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Fisher Scientific; США) при напряжении на эмиттере 2,1 кВ и температуре капилляра 240 °С. Для оценки дифференциально экспрессированных белков полученные первичные данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant 1.6 (алгоритм iBAQ) (Max-Planck-Institute of Biochemistry;

Германия). Дальнейшую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения Perseus и языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1 (R-Tools Technology; США). Для определения статистической достоверности наблюдаемых различий использовали *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование энтероцитов кишечника в условиях гипоксии стимулирует трансцитоз и ассоциировано с изменением экспрессии генов, вовлеченных в транспорт везикул

Условия культивирования энтероцитов кишечника, имитирующие гипоксию, создавали путем обработки CoCl_2 дифференцированных клеток аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2. На основании измерения импедансных спектров было показано, что обработка CoCl_2 не нарушает целостность монослоя Caco-2. Значение трансэпителиального сопротивления (TEER) сохраняется на уровне 2000 Ом, что свидетельствует об отсутствии выраженной цитотоксичности и гибели клеток.

Анализ профиля мРНК с помощью микрочипов показал, что обработка энтероцитов CoCl_2 приводит к изменению экспрессии в два и более раз ($\text{FDR} < 0,05$) 165 генов, среди которых значимое увеличение было выявлено для генов, вовлеченных в ответ клеток на гипоксию: *DDIT4* в 2,4, *EGLN1* в 2,7, *LDHA* в 2,0, *PFKFB3* в 2,1, *SLC2A1* в 3,1, *SLC2A3* в 3,0, а также *VEGFA* в 1,4. Изменение экспрессии данных генов было подтверждено методом ПРЦ-ПВ ($p < 0,05$). Кроме того, функциональная аннотация дифференциально экспрессированных генов с помощью базы данных DAVID выявила значимое обогащение для сигнального пути HIF-1, опосредующего ответ на гипоксию (данные не представлены). Таким образом, обработка энтероцитов CoCl_2 действительно имитирует условия гипоксии.

Для оценки эффективности трансцитоза через монослой энтероцитов кишечника в стандартных условиях культивирования и в условиях гипоксии дифференцированные клетки Caco-2 в мембранных вставках обрабатывали с апикальной стороны средой, содержащей биотинилированный лектин ризин. В контрольных лунках со стандартными условиями культивирования проводили замену среды с апикальной стороны на свежую без лектина. Через 1 и 6 ч после замены среды в верхней камере среду из нижней камеры полностью отбирали и анализировали в ней содержание лектина с помощью иммуноферментного анализа. Мониторинг параметров импедансной спектроскопии в течение 6 ч обработки клеток лектином свидетельствовал о сохранении целостности монослоя, что согласуется с ранее полученными данными [27]. При этом значение TEER через 6 ч обработки лектином даже возрастало, как в контроле, так и при гипоксии (рис. 1), что указывает на формирование более плотных межклеточных контактов. Таким образом, можно исключить возможность проникновения белковых молекул из верхней камеры мембранных вставок с монослоем энтероцитов в нижнюю путем парацитоза. Следовательно, попадание лектина из верхней камеры в нижнюю происходит только благодаря трансцитозу.

Результаты иммуноферментного анализа показали, что и при нормоксии и при гипоксии лектин действительно

подвергается трансцитозу энтероцитами. При этом в условиях гипоксии через 6 ч обнаружено увеличение в 1,8 раза ($p < 0,05$) количества лектина, подвергнувшегося трансцитозу по сравнению со стандартными условиями культивирования (рис. 2).

Отметим, что проведенный функциональный анализ дифференциально экспрессированных генов позволил идентифицировать 16 генов, вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул (табл. 1).

Для оценки изменения экспрессии генов в энтероцитах кишечника на уровне белка был проведен масс-спектрометрический анализ протеома. Общее число достоверно детектированных белков составило 3361. Содержание 237 белков достоверно различалось в 2 и более раз в энтероцитах, культивируемых при нормоксии и в условиях гипоксии. Из белков, кодируемых генами внутриклеточного транспорта везикул, экспрессия которых изменилась по данным микрочипов, в протеоме были обнаружены только четыре: apoB (ген *APOB*), SorLA-1 (ген *SORL1*), CAM-PRP (ген *PPP3CA*) и CEACAM1. При этом для apoB было показано достоверное снижение экспрессии (в 6,5 раза), что согласуется с данными транскриптомного анализа.

Регуляцию экспрессии генов *APOB*, *SORL1*, *PPP3CA* и *CEACAM1* в энтероцитах кишечника могут осуществлять микроРНК

Для выявления возможного механизма регуляции экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный

транспорт везикул, был проведен анализ профиля экспрессии микроРНК с помощью NGS. Достоверное изменение экспрессии в 1,5 и более раз ($p \leq 0,05$) было обнаружено для 16 микроРНК. Интересно, что семь из них являются регуляторами генов *APOB*, *SORL1*, *PPP3CA* и *CEACAM1* [25]. При этом направление изменения экспрессии данных микроРНК антикоррелировало с направлением изменения экспрессии соответствующих мРНК-мишеней (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Огромное число данных о механизмах внутриклеточного везикулярного транспорта было получено благодаря исследованию проникновения в клетку растительного лектина рицина [11]. Связывание рицина с гликозилированными белками на поверхности клетки индуцирует эндоцитоз и последующий его транспорт в составе везикул внутри клетки к аппарату Гольджи и эндоплазматическому ретикулуму. Благодаря использованию рицина были установлены многие особенности апикального и базолатерального транспорта, а также трансцитоза в поляризованных эпителиальных клетках.

С каждым годом все больше внимания уделяют роли гипоксии и обусловленной гипоксией сигнальных путей в физиологии и патофизиологии кишечника. Кишечный эпителий обычно находится в состоянии физиологической гипоксии, однако дополнительная тканевая гипоксия является признаком активного воспалительного процесса [10]. Важнейшее условие нормального функционирования

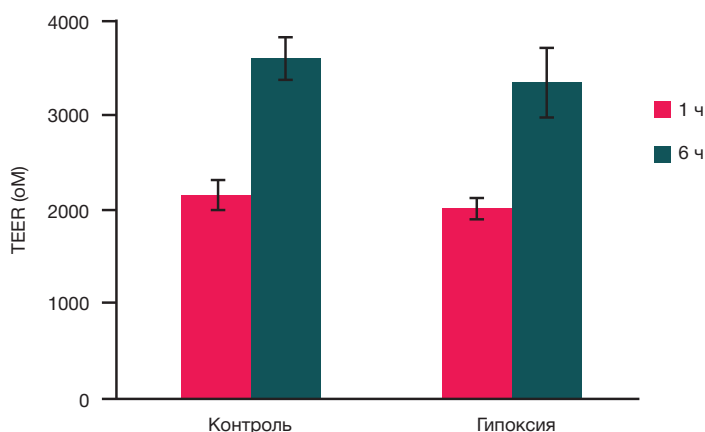


Рис. 1. Зависимость трансэпителиального сопротивления (TEER) от времени при обработке энтероцитов кишечника растительным лектином рицином

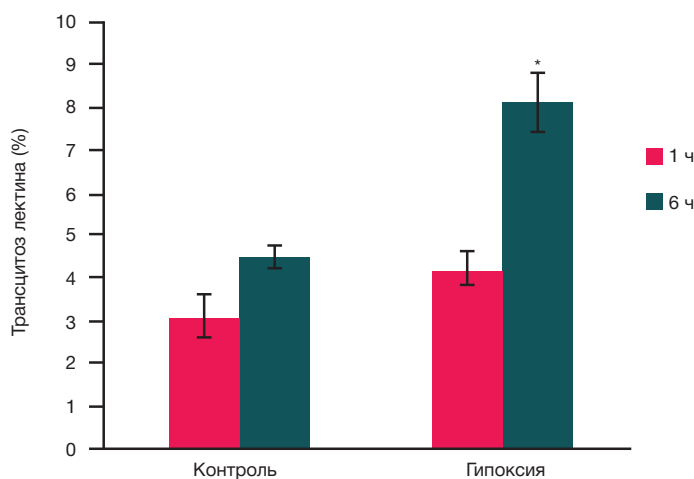


Рис. 2. Оценка количества биотинилированного лектина рицин, подвергнувшегося трансцитозу энтероцитами кишечника в стандартных условиях культивирования (контроль) и в условиях гипоксии; * — доля лектина, подвергнувшегося трансцитозу через 6 ч в условиях гипоксии достоверно отличается от контроля ($p < 0,05$)

кишечника — сохранение барьерных функций монослоя эпителиальных клеток, выстилающих его поверхность [2]. Однако опасность инфекционных заболеваний может сохраняться и при отсутствии очевидных нарушений монослоя клеток, причиной тому может быть изменение внутриклеточного транспорта везикул, содержащих бактерии, а именно трансцитоза [7, 28]. В нашей работе было показано, что в условиях гипоксии при сохранении целостности монослоя энтероцитов происходит значимое стимулирование трансцитоза лектина. Сравнительный анализ транскриптомов выявил изменение экспрессии генов, вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул, в клетках, культивируемых в условиях гипоксии. Значительное снижение *APOB*, одного из этих генов, было подтверждено и при анализе протеома. Интересно, что белок *apoB* является одним из ключевых регуляторов метаболизма липидов и холестерина энтероцитами [29, 30]. Локализуясь преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме, *apoB* способствует упаковке адсорбированных с апикальной стороны липидов и холестерина в пре-хиломикроны, *apoB*-содержащие частицы. Эти частицы в процессе транспорта в мембранных везикулах к аппарату Гольджи созревают до хиломикрон и секретируются с базолатеральной стороны энтероцитов посредством экзоцитоза. В здоровых энтероцитах кишечника образование *apoB*-содержащих частиц и их секреция происходят

постоянно [29]. Возможно, что значительное снижение экспрессии *apoB* может активировать компенсаторные механизмы секреции адсорбируемых и накапливающихся липидов и холестерина, например трансцитоза. Отметим также, что накапливаемые в клетках липиды и холестерин служат основным строительным материалом для формирования мембран, что в свою очередь тоже может изменять мембранный транспорт в энтероцитах.

Для выяснения механизма регуляции наблюдаемых изменений был проанализирован профиль экспрессии микроРНК. Интересно, что семь из 16 микроРНК, обнаруженных дифференциально экспрессированными в ответ на гипоксию, оказались регуляторами дифференциально экспрессированных генов внутриклеточного транспорта везикул. Кроме того, направление изменения экспрессии микроРНК антикоррелировало с направлением изменения экспрессии соответствующих мРНК-мишеней. Полученные данные указывают на то, что возможным механизмом регуляции свойств энтероцитов в условиях гипоксии может быть микроРНК-зависимый механизм.

ВЫВОДЫ

На модели энтероцитов кишечника человека показано, что гипоксия стимулирует процесс трансцитоза. Это сопровождается изменением экспрессии генов,

Таблица 1. Дифференциально экспрессированные гены, вовлеченные во внутриклеточный транспорт везикул

Ген	Изменение экспрессии, разы*	p-value	FDR
<i>OLR1</i>	-2,4	0,0003	0,004
<i>ADM</i>	2,1	0,0007	0,006
<i>LRP4</i>	1,5	0,0014	0,008
<i>SORL1</i>	1,9	0,0044	0,019
<i>LDLR</i>	1,9	0,0068	0,019
<i>ABCA1</i>	-2,1	0,0056	0,019
<i>SDCBP</i>	1,7	0,0097	0,024
<i>PPP3CA</i>	-1,6	0,0219	0,029
<i>APOB</i>	-2,1	0,0208	0,029
<i>CEACAM1</i>	1,8	0,0243	0,030
<i>ENPP1</i>	-1,8	0,0142	0,030
<i>ITGA2</i>	3,2	0,0203	0,031
<i>RAB27B</i>	-1,9	0,0201	0,034
<i>FCHSD2</i>	-1,6	0,0193	0,037
<i>SLC9B2</i>	-1,5	0,0381	0,043
<i>KIAA1107</i>	-1,7	0,0434	0,046

Примечание: * — представлено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) при гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью микрочипов. Отрицательное число означает, что экспрессия данного гена уменьшилась в соответствующее число раз

Таблица 2. Дифференциально экспрессированные микроРНК, регулирующие экспрессию белков внутриклеточного транспорта везикул

микроРНК	Изменение экспрессии, разы*	мРНК-мишень
<i>hsa-miR-27a-5p</i>	1,5	<i>APOB</i>
<i>hsa-miR-1303</i>	-2,1	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-100-5p</i>	-1,8	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-4521</i>	-1,6	<i>SORL1</i>
<i>hsa-miR-21-3p</i>	1,7	<i>PPP3CA</i>
<i>hsa-miR-32-3p</i>	-1,6	<i>CEACAM1</i>
<i>hsa-miR-148a-5p</i>	-1,5	<i>CEACAM1</i>

Примечание: * — представлено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) при гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью NGS. Отрицательное число означает, что экспрессия данной микроРНК уменьшилась в соответствующее число раз

вовлеченных во внутриклеточный транспорт везикул. Обнаружено, что гипоксия ассоциирована с падением экспрессии аРоВ, важнейшего регулятора метаболизма липидов, как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Механизм регуляции изменения свойств клеток может

включать регуляцию экспрессии генов посредством микроРНК. Дальнейшее изучение взаимосвязи метаболизма липидов и процесса трансцитоза позволит разработать препараты для снижения вероятности инфицирования тканей кишечника при воспалительных процессах.

Литература

- Chang C-S, Kao C-Y. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci.* 2019; 26 (1): 59.
- Solis AG, Klapholz M, Zhao J, Levy M. The bidirectional nature of microbiome-epithelial cell interactions. *Curr Opin Microbiol.* Elsevier Current Trends. 2020; 56: 45–51.
- Hu L, Tall BD, Curtis SK, Kopecko DJ. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun.* American Society for Microbiology Journals. 2008; 76 (11): 5294–304.
- Blanco LP, DiRita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. *Cell Microbiol.* 2006; 8 (6): 982–98.
- Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol Academic Press.* 2016; 420 (2): 262–70.
- Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol BioMed Central.* 2019; 13 (S1): 19.
- Panigrahi P, Bamford P, Horvath K, Morris JG, Gewolb IH. *Escherichia coli* transcytosis in a Caco-2 cell model: implications in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res Nature Publishing Group.* 1996; 40 (3): 415–21.
- Rubio APD, Martínez J, Palavecino M, Fuentes F, López CMS, Marcilla A, et al. Transcytosis of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model. *Sci Rep Nature Publishing Group.* 2020; 10 (1): 3120.
- Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe.* 2015; 17 (5): 662–71.
- Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* 2017; 19 (3): 210–21.
- Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen T-G. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett.* John Wiley & Sons, Ltd., 2010; 584 (12): 2626–34.
- Moisenovich M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe H, Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol.* 2002; 81 (10): 529–38.
- Khaustova NA, Maltseva DV, Oliveira-Ferrer L, Stürken C, Milde-Langosch K, Makarova JA, et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie.* 2017; 142: 197–206.
- Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the $\alpha 5$ laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie.* 2020; 174: 107–16.
- Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 7: 474.
- Tonevitsky AG, Agapov II, Shamshiev AT, Temyakov DE, Pohl P, Kirpichnikov MP. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.* 1996; 392 (2): 166–8.
- Moisenovich M, Tonevitsky A, Maljuchenko N, Kozlovskaya N, Agapov I, Volkmandt W, et al. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol.* 2004; 121 (6): 429–39.
- Agapov II, Tonevitsky AG, Moysenovich MM, Maluchenko NV, Weyhenmeyer R, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett.* 1999; 452 (3): 211–4.
- Agapov II, Tonevitsky AG, Maluchenko NV, Moisenovich MM, Bulah YS, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Lett.* 1999; 464 (1–2): 63–6.
- Pohl P, Antonenko YN, Evtodienko VY, Pohl EE, Saporov SM, Agapov II, et al. Membrane fusion mediated by ricin and viscumin. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1371 (1): 11–6.
- Kudriaeva A, Galatenko V, Maltseva D, Khaustova N, Kuzina E, Tonevitsky A, et al. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-Gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules.* 2017; 22 (5): 808.
- Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal.* 2011; 17 (1): 10.
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40 (1): 37–52.
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15 (12): 550.
- Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46 (D1): D239–45.
- Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One.* 2018; 13 (10): e0206239.
- Flora AD, Teel LD, Smith MA, Sinclair JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Ricin crosses polarized human intestinal cells and intestines of ricin-gavaged mice without evident damage and then disseminates to mouse kidneys. *PLoS One.* 2013; 8 (7): e69706.
- Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect.* 2008; 10 (4): 424–31.
- Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020; 17 (3): 169–83.
- Lo CC, Coschigano KT. ApoB48 as an efficient regulator of intestinal lipid transport. *Front Physiol.* 2020; 11: 796.

References

- Chang C-S, Kao C-Y. Current understanding of the gut microbiota shaping mechanisms. *J Biomed Sci.* 2019; 26 (1): 59.
- Solis AG, Klapholz M, Zhao J, Levy M. The bidirectional nature of microbiome-epithelial cell interactions. *Curr Opin Microbiol.* Elsevier Current Trends. 2020; 56: 45–51.
- Hu L, Tall BD, Curtis SK, Kopecko DJ. Enhanced microscopic definition of *Campylobacter jejuni* 81-176 adherence to, invasion of, translocation across, and exocytosis from polarized human

- intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun. American Society for Microbiology Journals*. 2008; 76 (11): 5294–304.
4. Blanco LP, DiRita VJ. Bacterial-associated cholera toxin and GM1 binding are required for transcytosis of classical biotype *Vibrio cholerae* through an in vitro M cell model system. *Cell Microbiol*. 2006; 8 (6): 982–98.
 5. Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol Academic Press*. 2016; 420 (2): 262–70.
 6. Sakharov D, Maltseva D, Knyazev E, Nikulin S, Poloznikov A, Shilin S, et al. Towards embedding Caco-2 model of gut interface in a microfluidic device to enable multi-organ models for systems biology. *BMC Syst Biol BioMed Central*. 2019; 13 (S1): 19.
 7. Panigrahi P, Bamford P, Horvath K, Morris JG, Gewolb IH. *Escherichia coli* transcytosis in a Caco-2 cell model: implications in neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res Nature Publishing Group*. 1996; 40 (3): 415–21.
 8. Rubio APD, Martínez J, Palavecino M, Fuentes F, López CMS, Marcilla A, et al. Transcytosis of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model. *Sci Rep Nature Publishing Group*. 2020; 10 (1): 3120.
 9. Kelly CJ, Zheng L, Campbell EL, Saeedi B, Scholz CC, Bayless AJ, et al. Crosstalk between microbiota-derived short-chain fatty acids and intestinal epithelial HIF augments tissue barrier function. *Cell Host Microbe*. 2015; 17 (5): 662–71.
 10. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect*. 2017; 19 (3): 210–21.
 11. Sandvig K, Torgersen ML, Engedal N, Skotland T, Iversen T-G. Protein toxins from plants and bacteria: Probes for intracellular transport and tools in medicine. *FEBS Lett. John Wiley & Sons, Ltd*. 2010; 584 (12): 2626–34.
 12. Moisenovich M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe H, Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumine in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol*. 2002; 81 (10): 529–38.
 13. Khaustova NA, Maltseva DV, Oliveira-Ferrer L, Stürken C, Milde-Langosch K, Makarova JA, et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*. 2017; 142: 197–206.
 14. Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the $\alpha 5$ laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie*. 2020; 174: 107–16.
 15. Gerasimenko T, Nikulin S, Zakharova G, Poloznikov A, Petrov V, Baranova A, et al. Impedance spectroscopy as a tool for monitoring performance in 3D models of epithelial tissues. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 7: 474.
 16. Tonevitsky AG, Agapov II, Shamshiev AT, Temyakov DE, Pohl P, Kirpichnikov MP. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett*. 1996; 392 (2): 166–8.
 17. Moisenovich M, Tonevitsky A, Maljuchenko N, Kozlovskaya N, Agapov I, Volkmandt W, et al. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol*. 2004; 121 (6): 429–39.
 18. Agapov II, Tonevitsky AG, Moisenovich MM, Maluchenko NV, Weyhenmeyer R, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin dissociates into catalytic and binding subunits before translocation across the membrane to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 1999; 452 (3): 211–4.
 19. Agapov II, Tonevitsky AG, Maluchenko NV, Moisenovich MM, Bulah YS, Kirpichnikov MP. Mistletoe lectin A-chain unfolds during the intracellular transport. *FEBS Lett*. 1999; 464 (1–2): 63–6.
 20. Pohl P, Antonenko YN, Evtodienko VY, Pohl EE, Saparov SM, Agapov II, et al. Membrane fusion mediated by ricin and viscumine. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1371 (1): 11–6.
 21. Kudriaeva A, Galatenko V, Maltseva D, Khaustova N, Kuzina E, Tonevitsky A, et al. The transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-Gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules*. 2017; 22 (5): 808.
 22. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. 2011; 17 (1): 10.
 23. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40 (1): 37–52.
 24. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15 (12): 550.
 25. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellos I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res*. 2018; 46 (D1): D239–45.
 26. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018; 13 (10): e0206239.
 27. Flora AD, Teel LD, Smith MA, Sinclair JF, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Ricin crosses polarized human intestinal cells and intestines of ricin-gavaged mice without evident damage and then disseminates to mouse kidneys. *PLoS One*. 2013; 8 (7): e69706.
 28. Macutkiewicz C, Carlson G, Clark E, Dobrindt U, Roberts I, Warhurst G. Characterisation of *Escherichia coli* strains involved in transcytosis across gut epithelial cells exposed to metabolic and inflammatory stress. *Microbes Infect*. 2008; 10 (4): 424–31.
 29. Ko C-W, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020; 17 (3): 169–83.
 30. Lo CC, Coschigano KT. ApoB48 as an efficient regulator of intestinal lipid transport. *Front Physiol*. 2020; 11: 796.