

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ α -СУБЪЕДИНИЦ ИНТЕГРИНОВ В КЛЕТКАХ КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЯ CACO-2 ПРИ ГИПОКСИИ В УСЛОВИЯХ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ

Д. В. Мальцева¹✉, А. А. Полозников¹, В. Г. Артюшенко²

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

² Art photonics GmbH, Берлин, Германия

Кишечный эпителий постоянно находится в условиях физиологической гипоксии. Дополнительная тканевая гипоксия способна приводить к нарушению его функций и является признаком активного воспалительного процесса. В исследованиях *in vitro* значительную роль играют условия культивирования, поскольку в свою очередь могут влиять на свойства клеток. Целью работы было провести оценку экспрессии интегринных рецепторов в клетках аденокарциномы толстого кишечника человека Caco-2 при моделировании условий гипоксии хлоридом кобальта (II) и микроциркуляции. С помощью транскриптомного анализа обнаружено значимое увеличение экспрессии генов $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц интегринных рецепторов *ITGA2* и *ITGA5* в условиях гипоксии и уменьшение *ITGA5* при инкубировании в микрофлюидном чипе. Экспрессия β -субъединиц при этом не изменилась. При анализе микроРНК-транскриптомов выявлено уменьшение экспрессии микроРНК hsa-miR-766-3p и hsa-miR-23b-5p. В число валидированных мишеней обеих микроРНК входит мРНК гена *ITGA5*. Показано, что микроциркуляция позволяет создать для энтероцитов кишечника условия культивирования, более близкие к физиологическим. Представлено обсуждение возможного биологического значения выявленных изменений экспрессии профиля интегринных рецепторов и роли микроциркуляции.

Ключевые слова: гипоксия, интегрины, микроРНК, мРНК, микрофлюидный чип, протеом, кишечная микробиота, Caco-2

Благодарности: авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования «Протеом человека» (ИБМХ) за возможность использования оборудования для анализа протеома, Центру высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова (Москва, Россия) за возможность использования молекулярно-генетических технологий.

Финансирование: результаты получены при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Министерства образования и науки. Уникальный идентификатор проекта RFMEFI61719X0056.

Вклад авторов: Д. В. Мальцева — работа с культурой клеток, молекулярно-биологические исследования, анализ данных, подготовка рукописи статьи; А. А. Полозников — обработка данных протеомного и транскриптомного анализа, биоинформатический анализ, функциональный анализ генов, статистический анализ, подготовка рукописи статьи, организация исследования; В. Г. Артюшенко — обсуждение результатов исследования, рецензирование рукописи статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

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

Статья получена: 09.11.2020 **Статья принята к печати:** 01.12.2020 **Опубликована онлайн:** 16.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.078

SELECTIVE CHANGES IN EXPRESSION OF INTEGRIN α -SUBUNITS IN THE INTESTINAL EPITHELIAL CACO-2 CELLS UNDER CONDITIONS OF HYPOXIA AND MICROCIRCULATION

Maltseva DV¹✉, Poloznikov AA¹, Artyushenko VG²

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

² Art photonics GmbH, Berlin, Germany

Intestinal epithelial cells are constantly exposed to physiologically hypoxic environment. The further reduction of tissue oxygen delivery may result in the intestinal epithelial cells function impairment, being a sign of active inflammation. The cell culture conditions are important when performing *in vitro* studies, since those may affect the cells' properties. The study was aimed to assess the integrin receptor expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cell line when simulating both the cobalt (II) chloride-induced hypoxia and microcirculation. Transcriptome analysis revealed the significantly increased expression of *ITGA2* and *ITGA5* genes, encoding $\alpha 2$ and $\alpha 5$ integrin subunits, under hypoxic conditions, as well as the reduction of *ITGA5* during incubation in the microfluidic chip. The expression of β -subunits did not change. Analysis of microRNA transcriptomes revealed the decreased expression of hsa-miR-766-3p and hsa-miR-23b-5p microRNA. One of the validated targets for both microRNAs is the *ITGA5* mRNA. It has been shown that microcirculation makes it possible to bring the intestinal epithelial cell culture conditions closer to physiological conditions. The possible biological significance of the detected integrin expression profile alterations and the role of microcirculation have been discussed.

Keywords: hypoxia, integrins, microfluidic chip, miRNA, mRNA, proteome, gut microbiota, Caco-2

Author contribution: Maltseva DV — working with cultured cells, molecular biology research, data analysis, manuscript writing; Poloznikov AA — proteomic and transcriptomic analysis data processing, bioinformatics analysis, functional analysis of genes, statistical analysis, manuscript writing, study management; Artyushenko VG — interpreting the study results, manuscript reviewing.

Acknowledgement: the authors express their appreciation to the Center for Collective Use "Human Proteome" (IBMC) for the opportunity to use the equipment for proteome analysis, and to the Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia) for the opportunity to use the molecular biology technologies.

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, project ID RFMEFI61719X0056.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

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

Received: 09.11.2020 **Accepted:** 01.12.2020 **Published online:** 16.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.078

В результате метаболизма комменсалитических бактерий кишечный эпителий в норме находится в состоянии физиологической гипоксии [1]. Однако в ходе паталогических процессов, включая воспалительные и опухолевые заболевания, в кишечнике возникает дополнительная тканевая гипоксия [2]. При этом можно наблюдать значительные изменения в транскриптоме клеток и структуре поверхности энтероцитов кишечника [3], что может послужить причиной нарушения важнейших свойств эпителия кишечника, включая реализацию барьерной функции и свойство дифференциальной абсорбции, а также нарушение взаимодействия с микробиотой. В связи с этими изменениями с каждым годом растет внимание к исследованию гипоксии на функционирование кишечника.

Для моделирования условий гипоксии в исследованиях *in vitro* используют несколько подходов: применение газовой смеси с пониженным содержанием кислорода [4] либо миметики, механизм действия которых основан на увеличении внутриклеточной концентрации HIF-1 α — фактора транскрипции, индуцируемого гипоксией. К таким миметикам гипоксии относят производные оксигинолина [5], хелаторы ионов Fe²⁺ и диметилксалилглицин (DMOG) [4], однако наиболее широко используют хлорид кобальта (II) (CoCl₂) [6], в том числе в исследованиях *in vitro* моделей кишечника [7]. Он стабилизирует факторы HIF-1 α и HIF-2 α , которые в норме быстро деградируют.

МикроРНК — класс коротких (в среднем 22 нуклеотида) некодирующих РНК, осуществляющих посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов [8]. Около половины генов микроРНК млекопитающих кодируются в интронах других генов. МикроРНК в комплексе с белками семейства Argonaute способны комплементарно взаимодействовать с мРНК-мишенью, причем комплементарность обычно неполная [8]. Как правило, для эффективного взаимодействия с мРНК достаточно полной комплементарности только в пределах 2-7/8 н. микроРНК (так называемый *seed region*), хотя нередко присутствует несколько дополнительных комплементарных нуклеотидов. Белки Argonaute привлекают другие белковые комплексы, осуществляющие репрессию трансляции и деградацию мРНК-мишени. Около 60% всех кодирующих белки генов регулируются микроРНК. К настоящему времени накоплено множество данных о ключевой роли микроРНК в широком спектре патофизиологических процессов, включая внутриклеточные и межклеточные взаимодействия [9], онкологические заболевания, бактериальные и вирусные инфекции [10]. Так, недавно были обнаружены семейства человеческих микроРНК hsa-let-7e / hsa-mir-125a и hsa-mir-141 / hsa-miR-200, регулирующие экспрессию генов ACE2 и TMPRSS2, являющихся входными воротами для коронавирусной инфекции [10].

Для моделирования кишечного барьера *in vitro* широко используют линию клеток Caco-2 [11]. Данная клеточная линия изначально была получена от пациента с аденокарциномой толстой кишки, однако по мере роста в культуре клетки Caco-2 дифференцируются, образуют монослой поляризованных призматических клеток, экспрессирующих целый ряд ферментов щеточной каемки и мембранных транспортеров, характерных для клеток эпителия тонкого кишечника [12]. Данные протеомного анализа свидетельствуют о близости дифференцированных клеток Caco-2 к нативным энтероцитам кишечника [13]. Фокусом исследования в настоящей работе является влияние гипоксии на адгезионные свойства

эпителия кишечника. Существенная роль в процессах адгезии принадлежит интегринам — суперсемейству трансмембранных рецепторов, ответственных за взаимодействие с компонентами внеклеточного матрикса, а также с белками, расположенными на поверхности других клеток, в том числе бактериальными. Все интегрины представляют собой гетеродимеры, состоящие из α - и β -субъединиц. У млекопитающих имеются 18 α - и 8 β -субъединиц, в клетках Caco-2 одними из основных являются α -2, 5, V и β -1, 3, 4 субъединицы [14], что совпадает с профилем субъединиц интегринов в первичных энтероцитах человека [15]. Целью работы было провести оценку изменений в транскриптоме и протеоме клеток Caco-2 в норме и в условиях гипоксии и сравнить полученные результаты с изменениями в транскриптоме клеток Caco-2 при культивировании в микрофлюидном чипе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии Caco-2

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 моделирования гипоксии в среду добавляли CoCl₂ (Sigma-Aldrich; США) до концентрации 300 мкМ и инкубировали 24 ч, как опубликовано ранее [7]. После инкубации клетки промывали 1 × DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома и протеома, как описано ранее [16].

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% 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.

Для оценки влияния перфузии на транскриптом клеток Caco-2 проводили культивирование в микрофлюидном чипе БАПР.942514.001 МЧ, разработанном в ходе выполнения работ по гранту Министерства образования и науки РФ по теме «Исследование адгезии бактерий в микрофлюидной модели кишечного барьера человека». Данный чип представляет собой проточную систему, содержащую две ячейки для культивирования клеток, каждая из которых разделена мембраной с порами 0,4 мкм.

Предварительно лунки микрофлюидного чипа покрывали ламином 332 (Biolamina; Швеция). Для этого вносили по 57 мкл раствора ламинина 332 в DPBS (0,01 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч в холодильнике при 4 °С. Затем открепляли клетки Caco-2 от подложки при помощи раствора трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса, после

чего ресуспендировали клетки в питательной среде и проводили подсчет их числа при помощи автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen; Германия). В каждую лунку чипа добавляли по 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 20 000 клеток Caco-2, и инкубировали чипы в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в течение 2 ч. После инкубации подключали чип к перистальтическому насосу и включали перфузию жидкости в режиме 50 мкл/ч. Клетки культивировали 2 дня, регулярно проверяя трансэпителиальное сопротивление (не менее двух раз в сутки) до достижения значения 350 Ом·см² в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C). По достижении состояния дифференцированных энтероцитов клетки промывали 1× DPBS (Gibco; США) и лизировали для анализа транскриптома, как описано ранее [16].

Исследование влияния покрытия мембраны коллагеном IV и ламинином 332 на пролиферацию клеток Caco-2

Поверхность мембранных вставок Transwell 96-луночного планшета Corning покрывали коллагеном IV и ламинином 332. Для этого в соответствующие вставки вносили 50 мкл раствора коллагена IV в DPBS (0,1 мг/мл) или 57 мкл раствора ламинина 332 в DPBS (0,01 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч в при 4 °C. Затем вставки отмывали от несвязавшегося компонента внеклеточного матрикса и заполняли лунки планшета питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю камеру). Планшет помещали в клеточный инкубатор (5% CO₂, 37 °C) и инкубировали 1 ч. После инкубации среду из мембранных вставок отбирали и вносили 50 мкл клеточной суспензии, содержащей 5000, 10 000 или 20 000 клеток, инкубировали в клеточном инкубаторе (5% CO₂, 37 °C) в течение 96 ч. После культивирования в среду добавлялся реагент MTS в конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали при 37 °C в течение 4 ч. Затем проводили измерение оптической плотности раствора при длине волны 590 нм.

Измерение импедансных спектров и вычисление электрических параметров

Измерение импедансных спектров проводили в диапазоне частот от 40 до 20 000 Гц при помощи системы импедансной спектроскопии («БиоКлиникум»; Россия) и

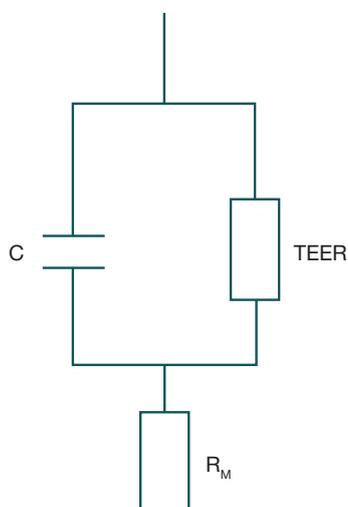


Рис. 1. Эквивалентная электрическая схема, использованная для вычисления основных электрических параметров монослоя клеток

электрода STX100C96 (World Precision Instruments; США) при комнатной температуре. Для получения средних значений электрических параметров использовали три независимые мембранные вставки с клетками. Расчет основных электрических параметров клеточного монослоя (трансэпителиального электрического сопротивления TEER (transepithelial electrical resistance), электрической емкости C, фонового сопротивления R_M) проводили при помощи программного обеспечения CEISA Impedance fitting («БиоКлиникум»; Россия) по эквивалентной электрической схеме монослоя клеток (рис. 1). Дальнейшую статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с графической оболочкой RStudio. Для оценки статистической значимости наблюдаемых различий TEER применяли двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Анализ транскриптомов

Анализ транскриптомов проводили с помощью микрочипов Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 для мРНК и Gene Chip miRNA 4.0 для микроРНК (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Выделение, анализ качества и количества РНК проводили, как описано ранее [16]. Значение параметра качества RIN (RNA integrity number) для всех исследуемых 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 по методике производителя. CEL-файлы, полученные при сканировании микрочипов, обрабатывали с помощью программного пакета Transcriptome Analysis Console 2.0 (ThermoFisher Scientific-Affymetrix; США). Для каждого гена на микрочипе представлено несколько проб к разным участкам гена, которые вместе формируют набор проб (или пробсет). Наборы проб на микрочипе, не соответствующие ни одному из известных на сегодняшний момент генов (неаннотированные наборы проб), из анализа были исключены. При оценке экспрессии генов в качестве порогового уровня сигнала на микрочипе было выбрано значение 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ)

ПЦР-РВ проводили, как описано ранее [16]. Детекцию накопления ПЦР-продукта в режиме реального времени проводили на основании разгорания флуоресценции SYBR Green I. В качестве референсных использовали транскрипты генов *ACTB* и *GAPDH* (средние значения пороговых циклов: 25,3 и 23,4 соответственно). Нуклеотидные последовательности праймеров («Синтол»; Россия) представлены в табл. 1.

Анализ протеомов клеток Caco-2

Подготовку проб клеток линии Caco-2, экстракцию тотального белка, гидролитическое расщепление и последующие процедуры проводили, как подробно описано ранее [16]. После трипсинолиза надосадочную жидкость анализировали на масс-спектрометре Q-exactive HFX в режиме положительной ионизации с использованием источника NESI (Thermo Fisher Scientific; США) при напряжении на эмиттере 2,1 кВ и температуре капилляра 240 °C. Количественную оценку содержания

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ. Нуклеотидные последовательности приведены в направлении от 5'-к 3'-концу

Обозначение гена	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>DDIT4</i>	gtttgaccgctccacgagcc	cgaagtcgggcaacgacacc
<i>EGLN1</i>	gacctgatacgcactgtaac	cggataacaagcaaccatg
<i>ITGA2</i>	gccataatccaagagtgtgtt	tattttctgcatattgaattgctc
<i>ITGA5</i>	agagctacgggccaagctaa	ttccccataaagtttggtccac
<i>LDHA</i>	atgggtgggtcctggggaa	tagcccaggatgtagccttga
<i>PFKFB3</i>	acgcctgtccttatggctg	ggcttttgggtgggtcgggg
<i>SLC2A1</i>	gcagatgatcgggagaagaaggt	atgaggatgggctggcggtag
<i>SLC2A3</i>	tggttattgtggccgaactc	ggtaatgaggaagccgggtga
<i>VEGFA</i>	tggcagaaggaggaggcag	aggggcacacaggatggctt
<i>GAPDH</i>	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatgggtgatggatttc
<i>ACTB</i>	ctggaacggtgaaggtgaca	aagggactcctgtaacacgca

белков проводили с использованием программного обеспечения Progenesis IQ (Waters; США), с параметрами, предлагаемыми производителем. Идентификацию белков проводили с помощью программы SearchGUI v.3.3.1 и базы данных HumanDB (UniProt Release 2018_05) со следующими поисковыми параметрами: расщепляющий фермент — трипсин, точность определения масс моноизотопных пептидов ± 5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS (тандемного масс-спектрометрического анализа) ± 25 ppm и возможность пропуска одного сайта расщепления. Для оценки дифференциально экспрессированных белков полученные первичные данные анализировали с помощью программного обеспечения MaxQuant 1.6 (Max-Planck-Institute of Biochemistry; Германия) (алгоритм iBAQ). 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.

Статистическая обработка данных

Исходные данные анализа микрочипов нормировали с использованием пакета *oligo* для языка программирования R [17]. Полученные данные логарифмировали по основанию 2. Анализ дифференциальной экспрессии генов и микроРНК проводили с помощью *t*-критерия

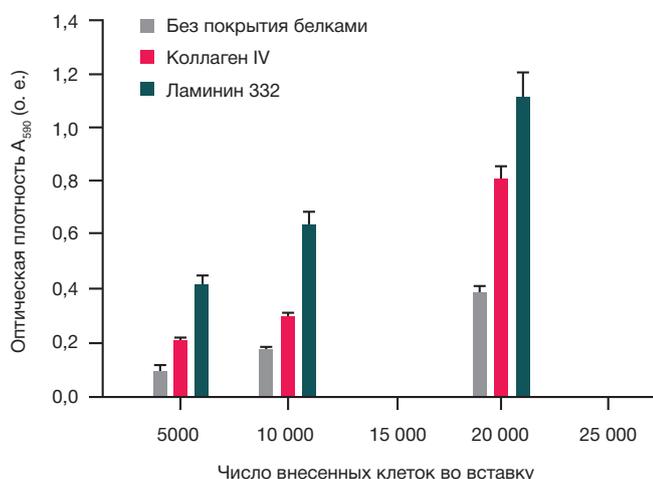


Рис. 2. Результаты оценки жизнеспособности клеток Caco-2 после 96 ч культивирования в мембранных вставках без покрытия белками, покрытых коллагеном IV и ламинином 332

Стьюдента. Поправку на множественную проверку гипотез осуществляли с помощью метода False Discovery Rate (FDR), представленного процедурой Бенджамини–Хохберга [18]. Для оценки индекса ложноположительности микроРНК использовали алгоритм, описанный ранее [19].

Функциональную аннотацию генов производили с помощью баз данных и алгоритмов DAVID версии 6.8 [20]. Валидированные взаимодействия микроРНК и генов-мишеней были экспортированы из базы данных DIANA-TarBase версии 8 [21]. Предсказание позиций связывания микроРНК на 3'-нетранслируемых областях мРНК-мишеней производили с помощью miRWalk [22]. Для поиска интронных микроРНК и их хост-генов использовали базу данных miRIAD [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обработка CoCl_2 имитирует гипоксию в клетках Caco-2 и вызывает рост экспрессии генов α -субъединиц интегринов

Из литературных данных известно, что покрытие мембраны, на которой происходит культивирование клеток Caco-2, белками внеклеточного матрикса, такими как коллагены и ламинины [24], может существенно влиять на скорость образования монослоя и дифференцировки данных клеток. Поэтому при оптимизации условий культивирования клеток, входящих в состав микрофлюидной модели кишечного барьера, было оценено влияние покрытия мембраны коллагеном IV и ламинином 332 на пролиферацию клеток Caco-2. Исследование проводили с использованием мембранных вставок Transwell Corning. Покрытие мембраны ламинином 332 позволяло более чем в два раза повысить пролиферацию клеток Caco-2 (рис. 2). Поэтому для дальнейшей работы были выбраны условия культивирования с предварительным покрытием мембраны ламинином 332.

Для имитации гипоксии клетки Caco-2 обрабатывали CoCl_2 (см. Материалы и методы). Влияние гипоксии на состояние монослоя клеток оценивали с помощью импедансной спектроскопии. Импедансная спектроскопия — это измерение импеданса (полного электрического сопротивления переменному синусоидальному току) при разных частотах электрического тока (см. Материалы и методы) [25]. Возможность и информативность применения импедансной спектроскопии для указанных задач подробно описана ранее [25]. Средние значения TEER как при гипоксии, так и при нормоксии были

выше 3000 Ом (соответствует удельному сопротивлению 429 Ом·см²). Значения TEER зависят как от внутриклеточного сопротивления, которое обусловлено состоянием трансмембранных каналов, проводящих ионы через клетку, так и от состояния межклеточных плотных контактов, отвечающих за парацеллюлярное сопротивление. Например, известно, что значения TEER сильно падают при понижении концентрации кальция в среде, так как эти ионы необходимы для поддержания нормальной структуры плотных контактов. В то же время, при гибели клеток нарушается целостность мембраны и сильно снижается внутриклеточное сопротивление. Наблюдаемые высокие значения TEER на протяжении всего эксперимента свидетельствуют об интактном состоянии плотных контактов и об отсутствии выраженной цитотоксичности, приводящей к гибели клеток (рис. 3).

С помощью микрочипов Affymetrix (TermoFisher Scientific-Affymetrix; США) провели анализ транскриптомов обработанных и контрольных клеток. В обработанных CoCl₂ образцах выявлен значимый рост экспрессии генов, вовлеченных в ответ на гипоксию в соответствии с [26], полученные изменения валидированы с помощью ПЦР-РВ (табл. 2). Всего с помощью микрочипов значимые изменения экспрессии (в два и более раз; FDR < 0,05) выявлены у 165 генов. Их функциональная аннотация с помощью баз данных и алгоритмов DAVID [20] показала значимое обогащение для сигнального пути HIF-1 (KEGG-путь hsa04066, HIF-1 signaling pathway), опосредующего ответ на гипоксию (табл. 3). Та же функциональная аннотация не выявила обогащения генов антиоксидантной защиты (GO:0016209, antioxidant activity). Масс-спектрометрический анализ протеома обработанных и контрольных клеток также не смог выявить существенный рост количества четырех белков, кодируемых генами HIF-1 сигнального пути: *ENO2* в 19,6, *HMOX1* в 29,1, *PDK1* в 2,8 и *SLC2A1* в 2,2 раза соответственно. Всего в ходе протеомного анализа было выявлено 120 белков, значимо изменивших свою экспрессию в условиях имитации гипоксии.

При сравнении транскриптомов обработанных CoCl₂ и контрольных клеток обнаружено значимое увеличение экспрессии двух генов, кодирующих α -субъединицы интегринов: в условиях имитации гипоксии экспрессия гена *ITGA2* возросла в 3,2 ($p = 0,02$), а *ITGA5* — в 1,9 раза ($p = 0,0088$). Изменения также были валидированы с помощью ПЦР-РВ: экспрессия *ITGA2* и *ITGA5* возросла в 3,5 и 2,0 раза соответственно. У генов β -субъединиц рост экспрессии обнаружен не был. При анализе протеомов из всех β -субъединиц были детектированы только $\beta 1$ - и $\beta 4$ -субъединицы, и их экспрессия в условиях гипоксии не изменилась. В клетках Caco-2 эти две субъединицы составляют более 90% от общего количества β -субъединиц [14]. α -Субъединицы детектированы в протеоме не были. Вероятно, это связано с недостаточной чувствительностью использованного нами анализа. Кроме того, ранее показано, что в клетках Caco-2 количество $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц соответственно в 10 и 100 раз ниже, чем количество $\beta 1$ -субъединиц [14]. Важно, что при культивировании клеток Caco-2 в микрофлюидном чипе экспрессия в *ITGA5*, наоборот, снижалась в 2,1 раза. Наблюдалось также уменьшение в 1,6 раза экспрессии гена *LAMA1*, кодирующего $\alpha 1$ -цепь ламининов, которая в норме отсутствует в здоровом кишечнике. Это свидетельствует о создании более физиологических условий для клеток кишечника в микрофлюидном чипе. Отметим, что достоверных изменений генов, вовлеченных

в ответ на гипоксию и в сигнальные пути HIF-1, по сравнению со статическими условиями, обнаружено не было.

Изменение экспрессии гена *ITGA5* сопровождается измененной экспрессией регулирующих его микроРНК

Для поиска возможных причин изменения экспрессии генов субъединиц интегринов *ITGA2* и *ITGA5* в ответ на имитацию гипоксии был проведен анализ микроРНК, осуществляющих регуляцию данных генов. С помощью микроРНК-микрочипов Affymetrix проанализировали микроРНК-транскриптомы обработанных CoCl₂ и контрольных клеток. Экспрессия девяти микроРНК была значимо изменена при имитации гипоксии. Две из них, hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p, оказались экспериментально подтвержденными регуляторами экспрессии гена *ITGA5* [27, 28]. При этом в состоянии гипоксии их экспрессия уменьшилась в 2,2 и в 2,1 раза ($p = 0,046$) соответственно, что противоположно изменению экспрессии их гена-мишени *ITGA5*.

Анализ позиций связывания данных микроРНК с 3'-нетранслируемой областью мРНК *ITGA5* показал, что обе микроРНК имеют полную комплементарность с мРНК-мишенью в области seed region (нуклеотиды 2-7/8 микроРНК) (рис. 4). Полная комплементарность в этом регионе является необходимым условием эффективного взаимодействия микроРНК и мРНК. Более того, обе микроРНК способны комплементарно взаимодействовать с мРНК *ITGA5* и вне seed region, что дополнительно повышает прочность связывания (см. рис. 4).

Гены обеих микроРНК локализованы в интронах: hsa-miR-23b-5p расположена в интроне гена *AOPEP*, hsa-miR-766-3p — в интроне гена *SEPTIN6*. Интересно, что в условиях моделирования гипоксии экспрессия данных хост-генов значимо не изменилась. Это может свидетельствовать о наличии у данных микроРНК независимых промоторов, что было ранее обнаружено для многих микроРНК, кодируемых интронами [29].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В условиях гипоксии, имитированной с помощью обработки хлоридом кобальта (II) клеток аденокарциномы

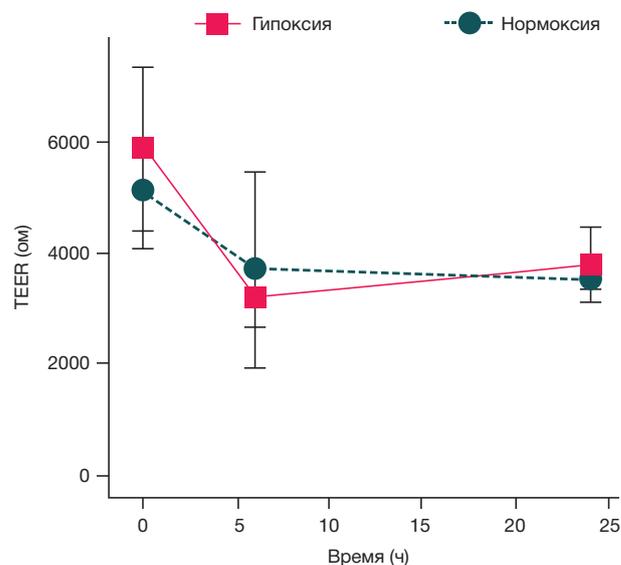


Рис. 3. Зависимость трансэпителиального сопротивления (TEER) от времени при нормоксии и гипоксии

Таблица 2. Дифференциальная экспрессия генов, вовлеченных в ответ на гипоксию*

Ген	ПЦР-РВ	Микрочипы
	Изменение экспрессии**	Изменение экспрессии**
<i>DDIT4</i>	2.7	2.4
<i>EGLN1</i>	3.4	2.7
<i>LDHA</i>	4	2.0
<i>PFKFB3</i>	4.3	2.1
<i>SLC2A1</i>	2.1	3.1
<i>SLC2A3</i>	6.1	3.0
<i>VEGFA</i>	2.4	1.4

Примечание: * — для анализа список генов, вовлеченных в ответ на гипоксию, сформирован на основании более ранних результатов [26]. ** — показано отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) в условиях моделирования гипоксии к контрольным образцам ($p < 0,05$ в ПЦР-РВ и микрочипах). Экспрессия всех представленных генов была увеличена при имитации гипоксии по отношению к контрольным образцам.

толстого кишечника Caco-2, обнаружен рост экспрессии генов, вовлеченных в сигнальный путь HIF-1. Полученные результаты хорошо согласуются с литературными данными об изменении транскриптома при воздействии хлоридом кобальта на клеточные линии Caco-2 [30] и Caki-1 [31].

При моделировании гипоксии было выявлено значимое повышение экспрессии генов *ITGA2* и *ITGA5*. Данные гены кодируют субъединицы $\alpha 2$ и $\alpha 5$ интегриновых рецепторов. Поскольку значимых изменений экспрессии β -субъединиц обнаружено не было, можно полагать, что в условиях гипоксии возросла доля рецепторов, содержащих $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединицы. Нами обнаружено, что в статических условиях выращивания в клетках Caco-2 экспрессия *ITGA5* была в 2,1 раза выше, чем при культивировании этих клеток в микрофлюидном чипе. Благодаря микроциркуляции создаются более близкие к физиологическим условия и улучшается снабжение клеток питательными веществами. Таким образом, изменение профиля интегриновых рецепторов (увеличение доли $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ -субъединиц) может быть реакцией клеток Caco-2 на ухудшение условий роста. В данной работе нами обнаружены возможные регуляторы изменения экспрессии *ITGA2* и *ITGA5* — микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p. Их экспрессия снижалась в условиях гипоксии. Стоит отметить, что помимо активности данных микроРНК могут присутствовать кофакторы, способствующие увеличению экспрессии *ITGA2* и *ITGA5*, например факторы транскрипции, регулирующие эти гены, экспрессия которых также была дифференциально изменена.

Существующая литература содержит небольшое количество информации о двух обнаруженных микроРНК. Так, известно, что уменьшение экспрессии hsa-miR-766-3p приводит к повышенной пролиферативной активности злокачественных клеток почки [32] и агрессивности

гепатоцеллюлярной карциномы [33]. Пониженная экспрессия hsa-miR-23b-5p приводит к повышенной пролиферативной и миграционной активности клеток аденокарциномы легкого [34].

Для выполнения функции рецептора цепи интегринов должны образоваться $\alpha\beta$ -гетеродимер. В клетках эпителия кишечника для $\alpha 2$ - и $\alpha 5$ - цепей одним из основных партнеров является $\beta 1$ -цепь. Основными лигандами интегринового рецептора $\alpha 2\beta 1$ являются ламинин, коллаген и эпителиальный кадгерин, а рецептор $\alpha 5\beta 1$ связывается с фибронектином [35]. Эти белки, в свою очередь, служат лигандами бактериальных адгезинов. Например, адгезин *YadA*, расположенный на внешней мембране грамотрицательных бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* (возбудителей тяжелых зоонозных заболеваний: псевдотуберкулеза и иерсениоза), связывается с коллагеном, ламинином и фибронектином [36]. Кроме того, белок инвазин, расположенный на внешней мембране патогенных бактерий рода *Yersenia*, селективно связывается с интегриновыми рецепторами семейства $\beta 1$, что приводит к транслокации бактерий через клетки эпителиального слоя [37]. Отметим, что имитация гипоксии миметиком DMOG в одном из исследований сопровождалась снижением чувствительности клеток Caco-2 к *Yersinia enterocolitica* при культивировании на пластиковой подложке [38], что авторы связывали со снижением экспрессии $\beta 1$ -цепи интегринов. В нашем исследовании при культивировании клеток на проницаемой мембранной вставке экспрессия $\beta 1$ -цепи интегринов не менялась, что, по-видимому, указывает на важность условий культивирования клеток при проведении подобных экспериментов. Нельзя, однако, исключать и различие специфического влияния конкретного миметика гипоксии.

Таблица 3. Дифференциальная экспрессия генов сигнального пути HIF-1

Ген	Изменение экспрессии*	p-value	FDR
<i>PFKFB3</i>	2,1	0,00016	0,0038
<i>ENO2</i>	3,0	0,00028	0,0043
<i>HMOX1</i>	2,5	0,0053	0,012
<i>HK2</i>	3,8	0,0077	0,013
<i>EGLN1</i>	2,7	0,014	0,018
<i>PDK1</i>	3,9	0,015	0,019
<i>ENO1</i>	2,3	0,018	0,022
<i>SLC2A1</i>	3,1	0,019	0,022

Примечание: * — приведено отношение уровней экспрессии (выраженных в условных единицах) в условиях моделирования гипоксии к контрольным образцам; результаты получены с помощью микрочипового транскриптомного анализа.

Таким образом, гипоксия энтероцитов кишечника, недостаточное снабжение их питательными веществами и избыток продуктов обмена приводят к изменению профиля экспрессии интегринов, что может способствовать повышению восприимчивости к ряду бактериальных патогенов. Регуляторами этого процесса могут служить микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p.

ВЫВОДЫ

Использование хлорида кобальта (II) позволило смоделировать гипоксию в клеточных линиях Caco-2. Результаты транскриптомного анализа продемонстрировали активацию ключевых участников сигнального пути HIF-1 и изменение профиля экспрессии интегринов в энтероцитах кишечника. Возможными регуляторами этого процесса могут служить микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p, экспрессия которых при имитации гипоксии уменьшилась в 2,2 и 2,1 раза соответственно. Использование условий

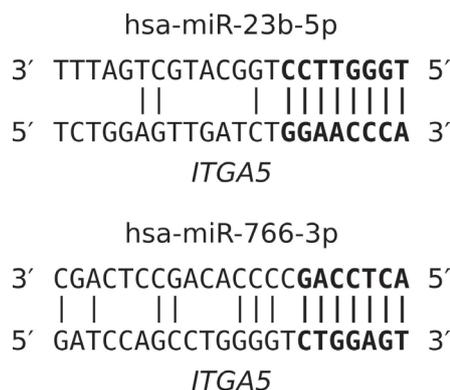


Рис. 4. Позиции связывания микроРНК hsa-miR-23b-5p и hsa-miR-766-3p с 3'-нетранслируемой областью мРНК *ITGA5*

микроциркуляции имеет обратное действие в отношении экспрессии *ITGA5* и не оказывает воздействия на экспрессию генов сигнального пути HIF-1.

Литература

- Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol. Academic Press*; 2016; 420 (2): 262–70.
- Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect. Elsevier Masson*; 2017; 19 (3): 210–21.
- Ward JBJ, Keely SJ, Keely SJ. Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport. *J Physiol. John Wiley & Sons, Ltd*; 2014; 592 (12): 2473–89.
- Pavlacky J, Polak J. Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front Endocrinol (Lausanne). Frontiers*; 2020; 11: 57.
- Poloznikov AA, Zakhariants AA, Nikulin S V, Smirnova NA, Hushpulian DM, Gaisina IN, et al. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide “tail”. *Biochimie*. 2017; 133: 74–9.
- Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol*. 2019; 39 (4): 556–70.
- Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. Maki CG, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2014; 9 (6): e99143.
- Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem. Urban & Fischer*; 2016; 51 (3–4): 33–49.
- Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet*. 2013; 4 (June): 119.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Turchinovich A, Knyazev E, Tonevitsky A. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PLoS One*. 2020; 15 (7 July).
- 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.
- Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog. American Chemical Society (ACS)*; 2006; 22 (1): 186–98.
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics. BioMed Central*; 2007; 8 (1): 91.
- Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P. The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. *J Pharm Sci. Elsevier*; 2016; 105 (2): 817–27.
- Beaulieu J-F. Integrins and human intestinal cell functions [Internet]. *Front Biosci*. 1999.
- Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the α5 laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie. Elsevier*; 2020; 174: 107–16.
- Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics. Oxford Academic*; 2010; 26 (19): 2363–7.
- Yoav B, Yosef H. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc*. 1995; 57 (1): 289–300.
- Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. A post-processing algorithm for miRNA microarray data. *Int J Mol Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020; 21 (4): 1228.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc. Nature Publishing Group*; 2009; 4 (1): 44–57.
- 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. Oxford Academic*; 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. *Campbell M, editor. PLoS One. Public Library of Science*; 2018; 13 (10): e0206239.
- Hinske LC, França GS, Torres HAM, Ohara DT, Lopes-Ramos CM, Heyn J, et al. miRIAD — integrating microRNA inter- and intragenic data. *Database. Oxford Academic*; 2014; 2014.
- Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest. American Society for Clinical Investigation*; 1992; 90 (1): 15–23.
- 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. Frontiers*; 2020; 7: 474.
- Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (14): 4587–602.

27. Karginov F V, Hannon GJ. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates with altered translation rates. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013; 27 (14): 1624–32.
28. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Kabos P, et al. Genome-wide analysis of miRNA-mRNA interactions in marrow stromal cells. *Stem Cells.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 32 (3): 662–73.
29. Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018; 24 (8): 991–1004.
30. Calvo-Anguiano G, Lugo-Trampe J, Camacho A, Said-Fernández S, Mercado-Hernández R, Zomosa-Signoret V, et al. Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. *Exp Ther Med.* Spandidos Publications; 2018; 15 (6): 4777–84.
31. Zhigalova N, Artemov A, Mazur AM, Prokhortchouk EB. Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl₂ treatment. *F1000Research.* F1000 Research Limited; 2015; 4: 1518.
32. Chen C, Xue S, Zhang J, Chen W, Gong D, Zheng J, et al. DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2017; 141 (9): 1867–78.
33. You Y, Que K, Zhou Y, Zhang Z, Zhao X, Gong J, et al. MicroRNA-766-3p inhibits tumour progression by targeting Wnt3a in hepatocellular carcinoma. *Molecules and Cells.* Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 41 (9): 830–41.
34. Hu G, Wang C, Wang H, Wang Y, Hu S, Cao Z, et al. Long noncoding RNA CCAT2 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXC1 expression by sponging miR-23b-5p in lung adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* John Wiley & Sons, Ltd; 2019; 120 (5): 7998–8007.
35. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007; 8 (5): 215.
36. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2006; 103 (9): 3375–80.
37. Isberg RR, Leong JM. Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* Cell Press; 1990; 60 (5): 861–71.
38. Zeitouni NE, Dersch P, Naim HY, von Kückritz-Blickwede M. Hypoxia decreases invasins-mediated Yersinia enterocolitica internalization into Caco-2 cells. *Karhausen J, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2016; 11 (1): e0146103.

References

1. Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Dev Biol.* Academic Press; 2016; 420 (2): 262–70.
2. Cummins EP, Crean D. Hypoxia and inflammatory bowel disease. *Microbes Infect.* Elsevier Masson; 2017; 19 (3): 210–21.
3. Ward JBJ, Keely SJ, Keely SJ. Oxygen in the regulation of intestinal epithelial transport. *J Physiol.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 592 (12): 2473–89.
4. Pavlacky J, Polak J. Technical feasibility and physiological relevance of hypoxic cell culture models. *Front Endocrinol (Lausanne).* Frontiers; 2020; 11: 57.
5. Poloznikov AA, Zakhariants AA, Nikulin S V, Smirnova NA, Hushpuliyan DM, Gaisina IN, et al. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide “tail”. *Biochimie.* 2017; 133: 74–9.
6. Muñoz-Sánchez J, Chánez-Cárdenas ME. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *J Appl Toxicol.* 2019; 39 (4): 556–70.
7. Lopez-Sánchez LM, Jimenez C, Valverde A, Hernandez V, Peñarando J, Martinez A, et al. CoCl₂, a mimic of hypoxia, induces formation of polyploid giant cells with stem characteristics in colon cancer. *Maki CG, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2014; 9 (6): e99143.
8. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, Lange T, Samatov TR, Turchinovich AA, et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem.* Urban & Fischer; 2016; 51 (3–4): 33–49.
9. Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function? *Front Genet.* 2013; 4 (June): 119.
10. Nersisyan S, Shkurnikov M, Turchinovich A, Knyazev E, Tonevitsky A. Integrative analysis of miRNA and mRNA sequencing data reveals potential regulatory mechanisms of ACE2 and TMPRSS2. *PLoS One.* 2020; 15 (7 July).
11. 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.
12. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* American Chemical Society (ACS); 2006; 22 (1): 186–98.
13. Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics.* BioMed Central; 2007; 8 (1): 91.
14. Ölander M, Wiśniewski JR, Matsson P, Lundquist P, Artursson P. The proteome of filter-grown Caco-2 cells with a focus on proteins involved in drug disposition. *J Pharm Sci.* Elsevier; 2016; 105 (2): 817–27.
15. Beaulieu J-F. Integrins and human intestinal cell functions [Internet]. *Front Biosci.* 1999.
16. Maltseva D, Raygorodskaya M, Knyazev E, Zgoda V, Tikhonova O, Zaidi S, et al. Knockdown of the α 5 laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. *Biochimie.* Elsevier; 2020; 174: 107–16.
17. Carvalho BS, Irizarry RA. A framework for oligonucleotide microarray preprocessing. *Bioinformatics.* Oxford Academic; 2010; 26 (19): 2363–7.
18. Yoav B, Yosef H. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc.* 1995; 57 (1): 289–300.
19. Nersisyan S, Shkurnikov M, Poloznikov A, Turchinovich A, Burwinkel B, Anisimov N, et al. A post-processing algorithm for miRNA microarray data. *Int J Mol Sci.* Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2020; 21 (4): 1228.
20. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* Nature Publishing Group; 2009; 4 (1): 44–57.
21. Karagkouni D, Paraskevopoulou MD, Chatzopoulos S, Vlachos IS, Tastsoglou S, Kanellis I, et al. DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. *Nucleic Acids Res.* Oxford Academic; 2018; 46 (D1): D239–45.
22. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *Campbell M, editor. PLoS One.* Public Library of Science; 2018; 13 (10): e0206239.
23. Hinske LC, França GS, Torres HAM, Ohara DT, Lopes-Ramos CM, Heyn J, et al. miRIAD — integrating microRNA inter- and intragenic data. *Database.* Oxford Academic; 2014; 2014.
24. Basson MD, Modlin IM, Madri JA. Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest.* American Society for Clinical Investigation; 1992; 90 (1): 15–23.
25. 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.* Frontiers; 2020; 7: 474.
26. Benita Y, Kikuchi H, Smith AD, Zhang MQ, Chung DC, Xavier RJ. An integrative genomics approach identifies Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1)-target genes that form the core response to hypoxia. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (14): 4587–602.
27. Karginov F V, Hannon GJ. Remodeling of Ago2-mRNA interactions upon cellular stress reflects miRNA complementarity and correlates

- with altered translation rates. *Genes Dev.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2013; 27 (14): 1624–32.
28. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Kabos P, et al. Genome-wide analysis of miRNA-mRNA interactions in marrow stromal cells. *Stem Cells.* John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 32 (3): 662–73.
 29. Steiman-Shimony A, Shtrikman O, Margalit H. Assessing the functional association of intronic miRNAs with their host genes. *RNA.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2018; 24 (8): 991–1004.
 30. Calvo-Anguiano G, Lugo-Trampe J, Camacho A, Said-Fernández S, Mercado-Hernández R, Zomosa-Signoret V, et al. Comparison of specific expression profile in two in vitro hypoxia models. *Exp Ther Med.* Spandidos Publications; 2018; 15 (6): 4777–84.
 31. Zhigalova N, Artemov A, Mazur AM, Prokhortchouk EB. Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl₂ treatment. *F1000Research.* F1000 Research Limited; 2015; 4: 1518.
 32. Chen C, Xue S, Zhang J, Chen W, Gong D, Zheng J, et al. DNA-methylation-mediated repression of miR-766-3p promotes cell proliferation via targeting SF2 expression in renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* John Wiley & Sons, Ltd; 2017; 141 (9): 1867–78.
 33. You Y, Que K, Zhou Y, Zhang Z, Zhao X, Gong J, et al. MicroRNA-766-3p inhibits tumour progression by targeting Wnt3a in hepatocellular carcinoma. *Molecules and Cells.* Korean Society for Molecular and Cellular Biology; 41 (9): 830–41.
 34. Hu G, Wang C, Wang H, Wang Y, Hu S, Cao Z, et al. Long noncoding RNA CCAT2 functions as a competitive endogenous RNA to regulate FOXC1 expression by sponging miR-23b-5p in lung adenocarcinoma. *J Cell Biochem.* John Wiley & Sons, Ltd; 2019; 120 (5): 7998–8007.
 35. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol.* 2007; 8 (5): 215.
 36. Heise T, Dersch P. Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* National Academy of Sciences; 2006; 103 (9): 3375–80.
 37. Isberg RR, Leong JM. Multiple β 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* Cell Press; 1990; 60 (5): 861–71.
 38. Zeitouni NE, Dersch P, Naim HY, von Kückritz-Blickwede M. Hypoxia decreases invasin-mediated Yersinia enterocolitica internalization into Caco-2 cells. Karhausen J, editor. *PLoS One.* Public Library of Science; 2016; 11 (1): e0146103.