

УДК 577.2+577.29577.151.45+577.214.5577.216.3+616-006.6+616-092.4

## ФАКТОРЫ, УЧАСТВУЮЩИЕ В СОЗРЕВАНИИ МИКРОРНК, ИЗМЕНЯЮТ УРОВЕНЬ СВОЕЙ ЭКСПРЕССИИ ПРИ ИМИТАЦИИ ГИПОКСИИ ПЛАЦЕНТЫ В КЛЕТКАХ BeWo b30

© 2020 г. С. А. Нерсисян<sup>1,2</sup>, М. Ю. Шкурников<sup>3</sup>, Е. Н. Князев<sup>4,5,\*</sup>

Представлено академиком РАН С.И. Колесниковым

Поступило 30.03.2020 г.

После доработки 17.04.2020 г.

Принято к публикации 17.04.2020 г.

Одним из основных осложнений беременности и причин материнской и перинатальной смертности является преэклампсия. Патогенез преэклампсии связывают с развитием гипоксии плаценты и плода и секрецией ряда эффекторных молекул. Клеточная линия хориокарциномы человека BeWo b30 часто используется в качестве модели плацентарного барьера. Было показано, что производные оксихинолина могут имитировать гипоксию за счет подавления HIF-пролилгидроксилаз и накопления HIF-1 $\alpha$ . Данное воздействие в том числе приводит к изменению экспрессии микроРНК и их генов-мишеней. Однако, при гипоксии в клетках может изменяться не только уровень отдельных микроРНК, но и соотношение изоформ микроРНК, предположительно, ввиду неточностей работы ферментов Drosha и Dicer. В данной работе было показано изменение экспрессии факторов, участвующих в процессе созревании микроРНК, при имитации гипоксии производным оксихинолина в клетках BeWo b30, что может являться одной из причин изменения соотношения изоформ микроРНК.

**Ключевые слова:** Drosha, Dicer, DGCR8, TARBP2, плацента, хориокарцинома, BeWo, микроРНК, изоформы микроРНК

**DOI:** 10.31857/S2686738920040186

Одним из основных осложнений беременности и причин материнской и перинатальной смертности является преэклампсия, патология,

*Список сокращений:* dsРНК – двуцепочечная РНК, FDR – False Discovery Rate, уровень ложноположительных результатов, HIF – Hypoxia-Inducible Factor, индуцируемый гипоксией фактор. ДМСО – диметилсульфоксид, ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

<sup>1</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>2</sup> Механико-математический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения “Национальный медицинский исследовательский центр радиологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

<sup>5</sup> Центр трансляционных технологий, Москва, Россия

\*e-mail: knyazevevg@gmail.com

патогенез которой связывают с нарушением маточно-плацентарного кровотока и развитием гипоксии плаценты и плода. По одной из теорий считается, что гипоксия плаценты является первичным фактором, ведущим к развитию заболевания: по-видимому, при гипоксии трофобласта в кровотоке матери и ребенка могут выделяться различные эффекторные молекулы, запускающие патологические изменения [3, 4]. Одним из таких классов молекул могут являться микроРНК – короткие некодирующие РНК, осуществляющие регуляцию экспрессии генов на посттранскрипционном уровне [5]. Известно, что последовательность микроРНК не всегда является канонической: встречаются изоформы микроРНК, которые могут быть короче или длиннее канонической формы на несколько нуклеотидов с 3'-или 5'-конца последовательности, причем такие изменения могут существенно изменять регуляторные мишени молекулы [6]. При имитации гипоксии в клетках BeWo b30 было показано изменение профиля экспрессии изоформ микроРНК и их генов-мишеней в клетке [7], в том числе в клетках эндотелия [8], которые также являются неотъемлемой частью плацентарного барьера. Молекулярные механизмы, лежащие в основе

формирования изоформ микроРНК, практически не изучены.

Механизм созревания микроРНК состоит из нескольких последовательных этапов. Вначале в процессе транскрипции в ядре клетки образуется молекула пре-микроРНК в форме шпильки. Далее происходит внутриядерный процессинг пре-микроРНК, целью которого является удаление неспаренных концов молекулы; главную роль на этом этапе играет комплекс, состоящий из двухцепочечной РНК (dsРНК), специфической эндорибонуклеазы Drossha и белка, связывающего dsРНК, DGCR8 [9]. Полученная молекула пре-микроРНК далее транспортируется в цитоплазму белками XPO5/RAN-GTP, где проходит второй этап процессинга с помощью комплекса белков Dicer и TARBP2, которые приводят к отрезанию петли шпильки пре-микроРНК, в результате чего образуется РНК-дуплекс, далее распадающийся на две зрелые цепи микроРНК [10]. Известно, что работа комплексов Drossha/DGCR8 и Dicer/TARBP2 зачастую происходит со смещениями в позициях разрезания шпильки, что в конечном счете приводит к образованию различных изоформ микроРНК, нуклеотидные последовательности которых отличаются друг от друга в нескольких позициях на концах молекул [6]. Более того, на работу комплексов могут оказывать сильное влияние ряд других белков, что может приводить к изменению профиля изоформ микроРНК [11]. Так, семейства РНК-связывающих белков DDX5 и DDX17 выполняют роль посредника между комплексом Drossha/DGCR8 и белками SMAD, SRSF1, SNIP1, TP53, оказывающими стимулирующее влияние на внутриядерный процессинг микроРНК. Примером другого регуляторного механизма является работа белков LIN28, KHSRP, HNRNPA1 и PACT, контролирующих как внутриядерный, так и цитоплазматический процессинг ярко экспрессированного семейства микроРНК let-7.

Клеточная линия хориокарциномы человека BeWo, в частности ее клон BeWo b30, часто используется для моделирования плацентарного барьера *in vitro*, поскольку имитирует свойства клеток трофобласта. Данная клеточная модель позволяет изучать транспортную, барьерную, секреторную и другие функции плацентарного барьера и имитировать различные патологические состояния [1]. Так, с помощью производного оксихинолина, ингибирующего ферменты HIF-пролилгидроксилазы, возможна имитация гипоксии за счет накопления HIF-1 $\alpha$  и регуляции экспрессии генов-мишеней, ассоциированных с ответом клетки на гипоксию [2].

Целью данного исследования являлось изучение изменения экспрессии белковых факторов,

участвующих в процессе созревания микроРНК, при имитации гипоксии в клетках BeWo b30.

Клетки культивировали на полиэфирных про-нищаемых вставках Corning Transwell площадью 0.143 см<sup>2</sup> с размером пор 1.0 мкм. После достижения конfluence монослоя, которая контролировалась с помощью импедансной спектроскопии [12–14] и проницаемости для ФИТЦ-декстрана массой 70 кДа, клетки инкубировали в течение 24 ч в присутствии производного оксихинолина D014-0021 в концентрации 10 мкМ, как описано ранее [15]. Поскольку D014-0021 перед добавлением в культуральную среду растворяется в диметилсульфоксиде (ДМСО), то в контрольном эксперименте в среду добавлялся ДМСО до 2 об. %. После 24-часовой инкубации клетки лизировались в Qiazol Lysis Reagent для дальнейшего выделения РНК с помощью набора реагентов Qiagen miRNeasy Micro Kit. После этого производился полногеномный транскриптомный анализ с помощью микрочипов Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0. Для поиска дифференциально представленных генов в клетках BeWo b30 в контрольных условиях и при имитации гипоксии был применен *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественность сравнений путем расчета значений False Discovery Rate (FDR). Различия экспрессии генов считались достоверными при  $FDR-p < 0.05$ . Вероятности, связанные с анализом обогащения регуляторных путей, были рассчитаны с помощью метода Монте Карло с количеством повторов, равным 100000. В результате анализа литературы было определено 24 гена, кодирующих белки, которые принимают участие в процессе созревания микроРНК (табл. 1).

При сравнении результатов транскриптомного анализа образцов с гипоксией против контрольной группы было выявлено 7637 дифференциально экспрессированных генов из 25683 возможных ( $FDR < 0.05$ ). Из 24 генов, ассоциированных с процессингом микроРНК, экспрессия 17 статистически значимо различалась при гипоксии и в нормальных условиях (в табл. 2 представлены 6 генов с наибольшей разницей экспрессии). Дифференциально экспрессированными оказались гены *DICER1* и *DGCR8*, что означает непосредственное изменение в деятельности комплексов, осуществляющих процессинг микроРНК. Более того, большинство РНК-связывающих белков, регулирующих деятельность комплексов Drossha/DGCR8 и Dicer/TARBP2, также оказались значимо дифференциально представленными на транскриптомном уровне. Для дополнительной валидации значимости найденных изменений, была оценена вероятность нахождения как минимум 17 генов со значимо измененным уровнем экспрессии при случайном выборе 24 из 25683 транскриптов, экспрессия 7637 кото-

**Таблица 1.** Перечень генов, вовлеченных в процесс созревания микроРНК

Функциональная группа	Гены
Регуляция активности комплекса Drosha/DGCR8	DROSHA, DGCR8, DDX5, SNIP1, HNRNPA1, SMAD7, SMAD3, SMAD5, SRSF1, SMAD1, SMAD9, SMAD2, DDX17, SMAD6, SMAD4
Транспорт пре-микроРНК	RAN, XPO5
Регуляция созревания пре-микроРНК	LIN28B, LIN28A, KHSRP, TP53
Регуляция активности комплекса Dicer/TARBP2	DICER1, PRKRA, TARBP2

**Таблица 2.** Изменение уровня экспрессии генов, вовлеченных в процесс созревания микроРНК, в клетках BeWo b30 в условиях гипоксии и в нормальных условиях

Название гена	Средний уровень экспрессии в клетках, подвергнутых гипоксии, log <sub>2</sub> (y.e.)	Средний уровень экспрессии в клетках в контрольных условиях, log <sub>2</sub> (y.e.)	Кратность изменения, раз	FDR <i>p</i> -значение
<i>SMAD7</i>	9.3	6.7	6	1.98 × 10 <sup>-3</sup>
<i>SNIP1</i>	11.5	9.1	5.3	5.01 × 10 <sup>-4</sup>
<i>DICER1</i>	12.0	13.0	2	2.38 × 10 <sup>-4</sup>
<i>DGCR8</i>	7.0	7.9	1.9	1.08 × 10 <sup>-3</sup>
<i>TP53</i>	11.6	10.7	1.9	2.84 × 10 <sup>-3</sup>
<i>DDX5</i>	15.3	16.0	1.6	2.86 × 10 <sup>-4</sup>

рых статистически значимо изменена. Вычисленная вероятность оказалась меньше  $1.6 \times 10^{-5}$ , что обосновывает неслучайность найденного обогащения списка генов.

Таким образом, было показано, что в модели плацентарного барьера на основе клеточной линии BeWo b30 при имитации гипоксии с помощью производного оксихинолина значимо изменяется уровень экспрессии большинства генов, кодирующих белки, которые вовлечены в молекулярный механизм процессинга микроРНК. Среди этих белков оказались как непосредственные ферменты-участники механизмов процессинга микроРНК, так и белки, косвенно регулирующие данный механизм путем воздействия на ключевых игроков. Данные результаты хорошо согласуются и дают теоретическое обоснование наблюдаемому при гипоксии изменению профиля экспрессии изоформ микроРНК.

**ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ**

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00145).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Kallol S., Moser-Haessig R., Ontsouka C.E., et al. // Placenta. 2018. V. 72–73. P. 48–52.*
- Osipyants A.I., Smirnova N.A., Khristichenko A.Y., et al. // Biochemistry. (Mosc). 2017. V. 82. № 10. P. 1207–1214.*
- Samatov T.R., Shkurnikov M.U., Tonevitskaya S.A., et al. // Prog. Histochem. Cytochem. 2015. V. 49. № 4. P. 21–29.*
- Hromadnikova I. // DNA Cell Biol. 2012. V. 31. № 7. P. 1221–32.*
- Ly Y., Lu C., Ji X., et al. // J. Cell. Physiol. 2019. V. 234. № 2. P. 1052–1061.*
- Muller H., Marzi M.J., Nicassio F. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2014. V. 2. P. 38.*
- Agrawal R., Pandey P., Jha P., et al. // BMC Genomics. 2014. V. 15. P. 686.*
- Voellenkle C., van Rooij J., Guffanti A., et al. // RNA. 2012. V. 18. № 3. P. 472–484.*
- Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Turchinovich A.A., et al. // Biochemistry. (Mosc). 2015. V. 80. № 9. P. 1117–1126.*
- Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., et al. // Nature. 2005. V. 436. № 7051. P. 740–744.*
- van Kouwenhove M., Kedde M., Agami R. // Nat. Rev. Cancer. 2011. V. 11. № 9. P. 644–656.*
- Nikulin S.V., Knyazev E.N., Poloznikov A.A., et al. // Mol. Biol. 2018. V. 52. № 4. P. 577–582.*
- Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. // Mol. Biol. 2019. V. 53. № 3. P. 411–418.*
- Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2018. V. 166. № 1. P. 35–38.*
- Knyazev E.N., Petrov V.A., Gazizov I.N., et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2019. V. 166. № 3. P. 369–372.*

## FACTORS INVOLVED IN miRNA PROCESSING CHANGE ITS EXPRESSION LEVEL DURING IMITATION OF HYPOXIA IN BeWo b30 CELLS

S. A. Nersisyan<sup>a,b</sup>, M. Yu. Shkurnikov<sup>c</sup>, and E. N. Knyazev<sup>d,e,#</sup>

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

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

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

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

<sup>e</sup> Translational Technology Center, Moscow, Russian Federation

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

Presented by Academician of the RAS S.I. Kolesnikov

One of the main complications of pregnancy and causes of maternal and perinatal mortality is preeclampsia. The pathophysiology of preeclampsia is associated with the development of placenta and fetal hypoxia and secretion of a number of effector molecules. The human choriocarcinoma cell line BeWo b30 is often used as a model of the placental barrier. It was shown that oxyquinoline derivatives can mimic hypoxia by suppressing HIF-prolyl hydroxylases and the accumulation of HIF-1 $\alpha$ . This effect also leads to a change in the expression of microRNAs and their target genes. However, during hypoxia, not only the level of individual miRNAs in cells, but also the ratio of miRNA isoforms (isomiRs) can change, presumably due to inaccuracies in the work of the Drosha and Dicer enzymes. In this work, we showed a change in the expression of factors involved in the maturation of miRNAs when simulating hypoxia with an oxyquinoline derivative in BeWo b30 cells, which may be one of the reasons for the change in the ratio of miRNA isoforms.

**Keywords:** Drosha, Dicer, DGCR8, TARBP2, placenta, choriocarcinoma, BeWo, miRNA, miRNA isoforms, isomiRs