

УДК 577.2+577.29+578.233.3+616-092.4

ИНДУКЦИЯ ГИПОКСИЧЕСКОГО ОТВЕТА В КЛЕТКАХ CACO-2 ПРИВОДИТ К УВЕЛИЧЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В ЭНДОЦИТОЗ И ТРАНСЦИТОЗ SARS-COV-2

© 2022 г. С. А. Нерсиян^{1,2,*}

Представлено академиком РАН А.Г. Габитовым

Поступило 08.06.2022 г.

После доработки 28.06.2022 г.

Принято к публикации 28.06.2022 г.

В настоящей работе оценивали влияние гипоксического ответа в клетках Caco-2 на экспрессию генов и микроРНК, вовлеченных в механизмы внутриклеточного транспорта вирусных частиц SARS-CoV-2, а именно, эндоцитоз и трансцитоз. С помощью секвенирования РНК показано, что при имитации гипоксии путем воздействия на клетки производного оксихинолина двукратно увеличивается экспрессия канонического рецептора *ACE2* для вируса SARS-CoV-2, а также экспрессия неканонического рецептора *TFRC*. Значимый рост экспрессии наблюдался для генов из семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL), играющих ключевую роль в трансцитозе: *LDLR*, *LRP1*, *LRP4* и *LRP5*. Повышение уровней экспрессии *LDLR* сопровождалось понижением экспрессии микроРНК *hsa-miR-148a-3p*, способной напрямую связываться с мРНК *LDLR*. Таким образом, в ходе гипоксического ответа в клетках Caco-2 повышается экспрессия генов, вовлеченных в механизмы эндоцитоза и трансцитоза вирусных частиц SARS-CoV-2.

Ключевые слова: Caco-2, кишечник, гипоксия, оксихинолин, SARS-CoV-2, ACE2, LDL, транскриптом, микроРНК

DOI: 10.31857/S2686738922050201

Список сокращений: ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени. GO – gene ontology. FDR – false discovery rate, уровень ложноположительных результатов. FPKM – fragments per kilobase of transcript per million mapped. HIF – hypoxia-inducible factor, индуцируемый гипоксией фактор. KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. RPM – reads per million mapped reads.

Активная репликация вируса SARS-CoV-2 в кишечнике может являться причиной возникновения симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта у пациентов с COVID-19 [1]. Известно, что в кишечнике значительной доли переболевших COVID-19 сохраняется вирусная РНК в промежутке от недели до нескольких месяцев. Более того, длительное присутствие вирусной РНК коррелирует с нарушениями пищеварения,

что может являться одним из факторов постковидного синдрома [2, 3]. Гипоксия является одним из основных индукторов патологий кишечника, включая воспаление и колоректальный рак [4]. Роль гипоксии во взаимодействиях SARS-CoV-2 и клеток кишечника на сегодняшний день не установлена.

Главными “входными воротами” в клетку для вирусной частицы SARS-CoV-2 является рецептор ACE2, экспрессирующийся на поверхности эпителиальных клеток многих органов, включая легкие и кишечник [5]. Дальнейшая судьба вируса может включать в себя трансцитоз, позволяющий вирусу пересекать кишечный барьер, что может иметь важное клиническое значение. Ранее было установлено, что одной из наиболее подходящих клеточных моделей для изучения эндоцитоза и трансцитоза вирусных частиц SARS-CoV-2 являются клеточные линии Caco-2, экспрессирующие все необходимые факторы [6].

МикроРНК – класс коротких некодирующих РНК, осуществляющих негативную регуляцию экспрессии генов. Связывание seed региона микроРНК (нуклеотиды 2–7 с 5'-конца молекулы) с 3'-нетранслируемой областью (3'-НТО) мРНК-мишени приводит к деградации мРНК или к

¹ Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Российская Федерация

² Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, Ереван, Армения

*e-mail: snersisyan@hse.ru

Таблица 1. Используемые для ПЦР-РВ праймеры и их эффективность

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Эффективность
<i>ACE2</i>	AGAGAAGTGGAGGTGGATGGTCTTT	GCGGGGTCACAGTATGTTTCATCA	2.10
<i>TFRC</i>	GTCCAGACAATCTCCAGAGCTGC	TCTGTTTTCCAGTCAGAGGGACAGT	1.97
<i>LDLR</i>	CATTGTCCTCCCCATCGTGCTC	AGCTGTAGCCGTCCTGGTTG	2.06
<i>LRP1</i>	GGCGTCACTTGCTTGCGCAA	TGAATCGGTCCGAGGGGCGAG	2.08
<i>LRP4</i>	GGGAGTGTGAGGAGGACGAGT	TGGCACTGCTGAGGGACAGTTC	1.98
<i>LRP5</i>	TGCGATGACCAGAGCGACGA	GCAGGCAGATGGCGTCACAG	1.97
<i>ACTB</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	AAGGGACTTCCTGTAACAACGCA	2.03

остановке трансляции [7, 8]. Нами ранее было показано, что семейство микроРНК miR-200 подавляет экспрессию ACE2 [9]. Поиск регуляторных механизмов для других генов, вовлеченных во взаимодействия SARS-CoV-2 и клеток, представляет большой интерес.

В настоящей работе с помощью секвенирования нового поколения был проанализирован профиль экспрессии генов и микроРНК дифференцированных клеток Caco-2 под воздействием производного оксихинолина, являющейся ингибитором HIF-пролилгидроксилазы и имитирующей гипоксию путем стабилизации HIF1A – главного транскрипционного фактора, индуцируемого гипоксией [10].

Эксперименты проводили аналогично исследованию [11]. Вкратце, клетки Caco-2 получали из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) и инкубировали 21 день в условиях для дифференцировки. Воздействие на клетки производили с помощью производного оксихинолина 4896–3212 (Исследовательский Институт Химического Разнообразия, Химки, Россия): 7-((4-(трет-бутил)фенил)((4-метилпиридин-2-ил)амино)метил)хинолин-8-ол (см. детали в [12]), концентрация – 5 мкМ. После 24-часовой инкубации клетки лизировали для дальнейшего анализа. В каждой группе (воздействие и контроль) использовали по три биологических повтора. РНК выделяли с помощью Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия). Приготовление библиотек для секвенирования мРНК и микроРНК проводили с помощью наборов Illumina Stranded mRNA Library Prep Kit и NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Kit for Illumina (Illumina, Сан-Диего, США) соответственно. Использовали секвенатор Illumina NextSeq 550.

Качество исходных FASTQ файлов секвенирования оценивали с помощью FastQC версии 0.11.9 (Babraham Bioinformatics, Кембридж, Англия), адаптеры прочтений обрезали с помощью cutadapt версии 2.10. Ненормированные таблицы экспрессий мРНК и микроРНК получали путем картирования прочтений секвенирования с по-

мощью STAR версии 2.7.5b и miRDeep2 версии 2.0.1.2 соответственно. Полученные таблицы нормировали и фильтровали с использованием edgeR версии 3.30.3, получая на выходе логарифмированные по основанию 2 шкалы fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM) и reads per million mapped reads (RPM) для мРНК и микроРНК секвенирований соответственно. Анализ дифференциальной экспрессии мРНК и микроРНК проводили с помощью DESeq2 версии 1.28.1. Значимыми считали изменения экспрессии с кратностью изменения не менее 1.5 и False Discovery Rate (FDR) <0.05 (для расчетов FDR использовали процедуру Бенджамини-Хохберга).

Валидацию изменений экспрессии ключевых мРНК проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с обратной транскрипцией аналогично исследованию [13]. Последовательности использованных праймеров приведены в табл. 1. Анализ дифференциальной экспрессии по данным ПЦР-РВ проводили с помощью метода $\Delta\Delta C_t$ и *t*-критерия Стьюдента, в качестве референсного гена использовали *ACTB*.

Гены, вовлеченные в процессы эндоцитоза и транцитоза, выделяли из базы данных Gene Ontology (GO). Анализ обогащения по функциональной принадлежности проводили с помощью веб-сервиса DAVID версии 2021 г., используя базу данных биологических путей Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Мишени микроРНК предсказывали с помощью веб-портала miRDB версии 6.0.

В результате сравнения профилей экспрессии мРНК между образцами с индуцированной гипоксией и контрольными клетками было найдено 6309 дифференциально экспрессированных генов. Анализ обогащения дифференциально экспрессированных генов по функциональной принадлежности выявил отчетливую активацию сигнального пути HIF1A (KEGG hsa04066, FDR <0.05) и анаэробного гликолиза (KEGG hsa00010, FDR <0.05), что является свидетельством индукции гипоксического ответа при обработке клеток

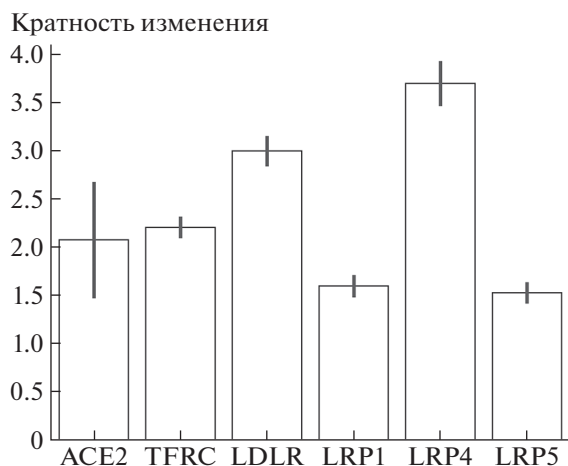


Рис. 1. Кратность изменения экспрессии генов *ACE2*, *TFRC*, *LDLR*, *LRP1*, *LRP4*, *LRP5* при гипоксическом ответе в клетках Сасо-2. Высота вертикальных отрезков обозначает стандартное отклонение, рассчитанное по трем экспериментальным и трем контрольным образцам с помощью DESeq2 (FDR <0.05 для всех генов).

Сасо-2 оксигинолином. Тот же анализ не выявил активацию путей, связанных с возможной токсичностью воздействия на клетки (в частности, апоптоз и репарация ДНК). Наблюдалось двукратное увеличение экспрессии гена *ACE2* (FDR <0.05), кодирующего основной рецептор для вируса SARS-CoV-2 (рис. 1). Помимо канонического рецептора было отмечено двукратное увеличение экспрессии мРНК рецептора трансферрина I *TFRC*, также способного к связыванию S-белка SARS-CoV-2 с последующим эндоцитозом вирусной частицы [14].

При анализе дифференциально экспрессированных генов, кодирующих белки, вовлеченные в эндоцитоз и трансцитоз, было отмечено статистически значимое повышение уровня экспрессии генов семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности (LDL), включая *LDLR* (кратность изменения 3.0), *LRP1* (кратность изменения 1.6), *LRP4* (кратность изменения 3.7), *LRP5* (кратность изменения 1.5), см. рис. 1. Одной из хорошо изученных функций данных рецепторов

является трансцитоз LDL через различные барьеры [15, 16]. Ранее было показано, что повышенная экспрессия рецептора LDLR является фактором тяжелого течения у пациентов с COVID-19 [17, 18]. Изменение экспрессии генов *ACE2*, *TFRC*, *LDLR*, *LRP1*, *LRP4*, *LRP5* было подтверждено с помощью ПЦР-РВ: статистически значимый рост уровней экспрессии ($p < 0.05$) наблюдался для всех генов, кратности изменения экспрессии, согласно ПЦР-РВ, были в 1–1.7 раза выше, чем по данным секвенирования РНК.

Для поиска возможных причин изменения экспрессии генов при гипоксическом ответе был проведен анализ дифференциально экспрессированных микроРНК, уровни экспрессии которых оценивали с помощью секвенирования. Двумя высокоэкспрессированными микроРНК со значимым (FDR <0.05) различием экспрессии в обработанных оксигинолином и контрольных клетках были hsa-miR-210-3p и hsa-miR-148a-3p. Экспрессия hsa-miR-210-3p возросла в 1.7 раза при воздействии оксигинолином, что является еще одним свидетельством успешной индукции гипоксического ответа – повышенная экспрессия hsa-miR-210-3p является общепринятым маркером клеточного ответа на гипоксию [19].

Следующая микроРНК, hsa-miR-148a-3p, являлась четвертой по абсолютному уровню экспрессии среди всех микроРНК контрольных клеток Сасо-2, занимая 7% от всех прочтений секвенирования. Снижение уровня экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p в полтора раза при воздействии оксигинолином являлось возможной причиной роста экспрессии гена *LDLR*. А именно, 3'-нетранслируемая область мРНК *LDLR* содержала два сайта связывания seed регионов микроРНК hsa-miR-148a-3p типов 7mer-m8 (комплементарность нуклеотидов 2–8 с 5'-конца микроРНК) и 8mer (7mer-m8, а также напротив 1-го нуклеотида с 5'-конца микроРНК расположен аденин), см. рис. 2. Взаимодействие hsa-miR-148a-3p и *LDLR* было ранее подтверждено с помощью люциферазных репортерных конструкций [20].

Таким образом, было показано, что при моделировании гипоксии производного оксигиноли-

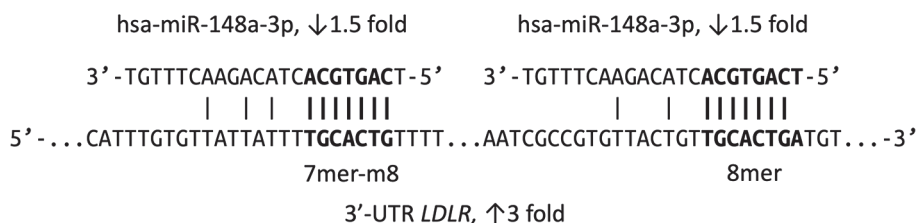


Рис. 2. Сайты связывания hsa-miR-148a-3p в 3'-нетранслируемой области мРНК *LDLR*. Жирным шрифтом выделены расширенные seed регионы микроРНК и соответствующие им участки мРНК-мишени.

на в клетках Сасо-2 повышается экспрессия генов *ACE2* и *TFRC*, кодирующих рецепторы, способные к связыванию с S-белком вируса SARS-CoV-2, а также повышение уровня экспрессии генов семейства рецепторов LDL, вовлеченных в механизмы эндоцитоза и трансцитоза. Одной из причин роста экспрессии гена *LDLR* могло служить снижение уровня экспрессии микроРНК hsa-miR-148a-3p, способной напрямую связываться с мРНК *LDLR*. Следовательно, гипоксия кишечника может являться неблагоприятным фактором при COVID-19.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60399.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Qian Q., Fan L., Liu W., Li J., Yue J., Wang M., Ke X., Yin Y., Chen Q., Jiang C. Direct Evidence of Active SARS-CoV-2 Replication in the Intestine. // *Clinical Infectious Diseases*. 2021. V. 73. P. 361–366.
2. Natarajan A., Zlitni S., Brooks E.F., Vance S.E., Dahlen A., Hedlin H., Park R.M., Han A., Schmidtke D.T., Verma R., Jacobson K.B., Parsonnet J., H.F. Bonilla, Singh U., Pinsky B.A., Andrews J.R., Jagannathan P., Bhatt A.S. Gastrointestinal symptoms and fecal shedding of SARS-CoV-2 RNA suggest prolonged gastrointestinal infection. // *Med (New York, N.Y.)* 2022.
3. Zollner A., Koch R., Jukic A., Pfister A., Meyer M., Rössler A., Kimpel J., Adolph T.E., Tilg H., Postacute COVID-19 is Characterized by Gut Viral Antigen Persistence in Inflammatory Bowel Diseases. // *Gastroenterology*. (2022).
4. Singhal R., Shah Y.M., Oxygen battle in the gut: Hypoxia and hypoxia-inducible factors in metabolic and inflammatory responses in the intestine. // *The Journal of Biological Chemistry*. 2020. V. 295. P. 10493–10505.
5. Sungnak W., Huang N., Bécavin C., Berg M., Queen R., Litvinukova M., Talavera-López C., Maatz H., Reichart D., Sampaziotis F., Worlock K.B., Yoshida M., Barnes J.L. HCA Lung Biological Network, SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. P. 681–687.
6. Knyazev E., Nersisyan S., Tonevitsky A. Endocytosis and Transcytosis of SARS-CoV-2 Across the Intestinal Epithelium and Other Tissue Barriers. // *Frontiers in Immunology*. 2021. V. 12. P. 636966.
7. Nersisyan S., Shkurnikov M., Poloznikov A., Turchinovich A., Burwinkel B., Anisimov N., Tonevitsky A. A Post-Processing Algorithm for miRNA Microarray Data. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21.
8. Turchinovich A., Tonevitsky A.G., Cho W.C., Burwinkel B. Check and mate to exosomal extracellular miRNA: new lesson from a new approach. // *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2015. V. 2. P. 11.
9. 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. V. 15. P. e0235987.
10. Poloznikov A.A., Nersisyan S.A., Hushpulian D.M., Kazakov E.H., Tonevitsky A.G., Kazakov S.V., Vechorko V.I., Nikulin S.V., Makarova J.A., Gazaryan I.G. HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitors for COVID-19 Treatment: Pros and Cons. // *Frontiers in Pharmacology*. 2020. V. 11. P. 621054.
11. Nersisyan S., Galatenko A., Chekova M., Tonevitsky A. Hypoxia-Induced miR-148a Downregulation Contributes to Poor Survival in Colorectal Cancer. // *Frontiers in Genetics*. 2021. V. 12. P. 662468.
12. Savyuk M., Krivonosov M., Mishchenko T., Gazaryan I., Ivanchenko M., Khristichenko A., Poloznikov A., Hushpulian D., Nikulin S., Tonevitsky E., Abuзарова G., Mitroshina E., Vedunova M. Neuroprotective Effect of HIF Prolyl Hydroxylase Inhibition in an In Vitro Hypoxia Model. // *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2020. V. 9. P. 662.
13. Maltseva D., Raygorodskaya M., Knyazev E., Zgoda V., Tikhonova O., Zaidi S., Nikulin S., Baranova A., Turchinovich A., Rodin S., Tonevitsky A. Knockdown of the $\alpha 5$ laminin chain affects differentiation of colorectal cancer cells and their sensitivity to chemotherapy. // *Biochimie*. 2020. V. 174. P. 107–116.
14. Tang X., Yang M., Duan Z., Liao Z., Liu L., Cheng R., Fang M., Wang G., Liu H., Xu J., Kamau P.M., Zhang Z., Yang L., Zhao X., Peng X., Lai R. Transferrin receptor is another receptor for SARS-CoV-2 entry. // *BioRxiv*. 2020. 2020.10.23.350348.
15. Dehouck B., Fenart L., Dehouck M.P., Pierce A., Torpier G., Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. // *The Journal of Cell Biology*. 1997. V. 138. P. 877–889.
16. Zhang X., Sessa W.C., Fernández-Hernando C. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2018. V. 5. P. 130.
17. Vlasov I., Panteleeva A., Usenko T., Nikolaev M., Izumchenko A., Gavrilova E., Shlyk I., Miroshnikova V., Shadrina M., Polushin Y., Pchelina S., Slonimsky P. Transcriptomic Profiles Reveal Downregulation of Low-Density Lipoprotein Particle Receptor Pathway Activity in Patients Surviving Severe COVID-19. // *Cells*. 2021. V. 10.
18. Cure E., Cumhur M. Cure. Strong relationship between cholesterol, low-density lipoprotein receptor, Na⁺/H⁺ exchanger, and SARS-COV-2: this association may be the cause of death in the patient with COVID-19. // *Lipids in Health and Disease*. 2021. V. 20. P. 179.
19. Huang X., Le Q.-T., Giaccia A.J. MiR-210—micromanager of the hypoxia pathway. // *Trends in Molecular Medicine*. 2010. V. 16. 230–237.
20. Goedeke L., Rotllan N., Canfrán-Duque A., Aranda J.F., Ramírez C.M., Araldi E., Lin C.-S., Anderson N.N., Wagschal A., de Cabo R., Horton, J.D. Lasunción M.A., Näär A.M., Suárez Y., Fernández-Hernando C. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. // *Nature Medicine*. 2015. V. 21. P. 1280–1289.

INDUCTION OF HYPOXIC RESPONSE IN Caco-2 CELLS PROMOTE THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN SARS-CoV-2 ENDOCYTOSIS AND TRANSCYTOSIS

S. A. Nersisyan^{a,b,#}

^a Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Molecular Biology (IMB), the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Yerevan, Armenia

[#]e-mail: snersisyan@hse.ru

Presented by Academician of the RAS A.G. Gabibov

In the present manuscript we analyzed the influence of hypoxic response in Caco-2 cells on the expression of genes and miRNAs involved in the mechanisms of intracellular transport of SARS-CoV-2 viral particles, especially endocytosis and transcytosis. With the use of RNA sequencing of Caco-2 cells treated by hypoxia-inducing oxyquinoline derivative, we showed two-fold increase in the expression of the main SARS-CoV-2 receptor ACE2. Expression of the non-canonical receptor TFRC was also elevated. We also observed a significant increase in the expression levels of genes from the low-density lipoprotein (LDL) receptor family, which play a crucial role in the transcytosis: *LDLR*, *LRP1*, *LRP4* u *LRP5*. Upregulation of *LDLR* was coupled with the downregulation of hsa-miR-148a-3p, which can directly bind to *LDLR* mRNA. Thus, the hypoxic response in Caco-2 cells includes upregulation of genes involved in the mechanisms of endocytosis and transcytosis of SARS-CoV-2 viral particles.

Keywords: Caco-2, intestine, hypoxia, oxyquinoline, SARS-CoV-2, ACE2, LDL, transcriptome, miRNA