

УДК 576.5, 57.085.2

Ламинин 521 изменяет экспрессию генов *SNAI1*, *ZNF708* и *GRN* в клетках *BeWo b30* и создает физиологические условия для плацентарного барьера

© 2019 Е.А. КНЯЗЕВА¹, Е.Н. КНЯЗЕВ^{1,2,3,*}, Т.Н. ГЕРАСИМЕНКО¹, О.В. КИНДЕЕВА^{1,3}, Д.В. МАЛЬЦЕВА^{1,2}, А. ТУРЧИНОВИЧ^{4,5}, А.А. СЕРГИЕВИЧ³

¹ООО Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117198

³ФГАОУ ВО Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091

⁴SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany

⁵Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120 Germany

*e-mail: e.knyazev@bioclinicum.ru

Поступила в редакцию 19.09.2019 г.

После доработки 30.09.2019 г.

Принята к публикации 16.10.2019 г.

Клетки хориокарциномы человека *BeWo b30* позволяют моделировать плацентарный барьер, имитируя клетки цитотрофобласта. Поскольку данные клетки могут образовывать многослойные структуры, был разработан метод контроля числа клеток на основе MTS-теста. Было выявлено, что при культивировании клеток на ламинине 521 происходит значимое изменение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) и электрической емкости монослоя клеток, по сравнению с условиями культивирования без внеклеточного матрикса. Транскриптомный анализ клеток без внеклеточного матрикса и культивируемых на ламинине 521 выявил, что при наличии ламинина происходит понижение экспрессии гена *ZNF708* и повышение экспрессии генов *SNAI1* и програнулина *GRN*, что может указывать на подготовку клеток к слиянию в синцитиотрофобласт. Также было отмечено изменение экспрессии пяти генов микроРНК и одного гена малой ядерной РНК. Наблюдаемый эффект мог быть обусловлен влиянием используемого ламинина.

Ключевые слова: *BeWo b30*, плацента, барьер, микроРНК, ламинин 521 (ламинин-11), *SNAI1*

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-87-93

Плацента является ключевым органом, регулирующим транспорт различных веществ между кровотоком матери и ребенка во время беременности [1]. Плацентарный барьер представляет собой слой клеток трофобласта и слой клеток эндотелия сосудов ребенка, которые разделены слившейся базальной мембраной данных клеток.

Одним из основных компонентов базальной мембраны являются белки ламинины, непосредственно контактирующие с клетками [2]. Гетеротримеры ламинины состоят из альфа-, бета- и гамма-цепи. В зависимости от того, какие цепи входят в состав ламинина, проявляются различные биологические эффекты при взаимодействии клеток с

Список сокращений: кДНК – комплементарная ДНК; ОП – оптическая плотность; ЦКП – центр коллективного пользования; ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота; DMEM (от англ. Dulbecco's Modified Eagle Medium) – среда Игла в модификации Дульбекко; DPBS (от англ. Dulbecco's phosphate-buffered saline) – натрий-фосфатный буфер Дульбекко; MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум; TEER (от англ. Transepithelial electrical resistance) – трансэпителиальное электрическое сопротивление.

данными ламининами [3]. Плацента является богатым источником ламининов, в частности, на различных этапах ее развития в ней обнаруживаются ламинины 111, 511 и 521 [4].

Моделирование органов *in vitro* в микрофлюидных устройствах является эффективным методом изучения транспорта веществ и влияния на состояние органов различных факторов, включая внеклеточный матрикс и лекарственные средства. В данных моделях используются человеческие клетки, что приближает модель к реальным условиям. Ранее было разработано микрофлюидное устройство для выращивания моделей органов в чипе [5–7], которое также может использоваться для моделирования плацентарного барьера. Для моделирования клеток трофобласта в составе плаценты наиболее часто используется линия хориокарциномы человека BeWo, в частности ее клон b30. Данные клетки обладают хорошей адгезией к субстрату, способны дифференцироваться в клетки цитотрофобласта, секретировать характерные для трофобласта гормоны и образовывать конфлюэнтный монослой, обладающий барьерно-транспортной функцией. Модели плацентарного барьера *in vitro* являются компромиссом между исследованиями с участием людей или послеродовой плаценты вне организма и экспериментами на животных [8]. Однако стоит отметить, что клетки BeWo b30 не обладают контактным торможением, поэтому могут формировать многослойные структуры [9]. В связи с этим важным является разработка методов контроля числа клеток в экспериментах с BeWo b30.

Одним из способов улучшения моделей плацентарного барьера *in vitro* является создание подходящего микроокружения, которое будет приближать модель к физиологическим условиям. В частности, создание микроциркуляции питательной среды позволяет имитировать естественный кровоток [10]. Кроме того, покрытие культуральных поверхностей внеклеточным матриксом, например, ламининами, также способно значительно изменять свойства клеток, приближая их к реальным условиям [11, 12].

Ранее ламинины получали только из животных тканей в виде смеси различных типов ламининов, однако с появлением возможности синтезировать рекомбинантные ламинины стало возможным исследовать влияние на клетки отдельных видов ламининов [13].

Цель данного исследования – изучение влияния ламинина 521 на свойства монослоя клеток BeWo b30 как модели плацентарного барьера

in vitro и разработка метода контроля количества клеток BeWo b30 при культивировании во вставках Transwell.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал

Клон линии клеток хориокарциномы BeWo b30 был получен от профессора Кристианы Альбрехт (Университет Берна, Швейцария) по разрешению доктора Алана Шварца (Университет Вашингтона в Сент-Луисе, США). Клетки культивировались в стандартных культуральных планшетах с площадью 75 см² в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) без L-глутамин и пирувата (Gibco, США) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки One Shot (Gibco), 2 мМ L-глутамин стерильного для питательных сред («ПанЭко», Россия), 1%-ного раствора заменимых аминокислот MEM Non-essential Amino Acid Solution 100x (Gibco) и раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco) до финальной концентрации 100 ед/мл и 100 мкг/мл, соответственно, при 37 °С и 5% CO₂ в клеточном CO₂-инкубаторе. Пересев клеток проводился каждые 2–3 дня.

Определение количества клеток по концентрации двухцепочечной ДНК и с помощью MTS-теста

Для разработки методики оценки количества клеток BeWo b30 клетки снимали с культуральных планшетов с помощью 0,25%-ного раствора трипсина-ЭДТА с солями Хенкса (ПанЭко), после чего трипсин инактивировали добавлением фетальной бычьей сыворотки, клетки центрифугировали, отбирали супернатант и затем клетки ресуспендировали в культуральной среде.

Концентрация клеток в суспензии определялась с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). После этого суспензия титровалась, чтобы получить в отдельных пробирках разные количества клеток: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 и 300 тыс. клеток. В пробирках клетки центрифугировали и супернатант заменяли на 50 мкл 0,1%-ного раствора додецилсульфата натрия. Для разрушения мембран клетки тщательно перемешивали с помощью центрифуги-вортекса Microspin FV-2400 (BioSan, Латвия) и на флуориметре Qubit 2.0 определяли концентрацию двухцепочечной ДНК с помощью набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

В качестве альтернативного метода определения количества клеток использовался MTS-метод.

Клетки BeWo b30 добавлялись в культуральные вставки 96-луночных культуральных систем Corning HTS Transwell (Merck, США) площадью 0,143 см² в известном количестве: 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200 и 300 тыс. клеток на вставку. Клеткам давали возможность прикрепиться к поверхности в течение 24 ч. После этого производили замену среды на смесь среды и реагента MTS из расчета 20 мкл реагента на 100 мкл среды, при этом во вставки с клетками наливали 100 мкл смеси, а в лунки под клетками – 200 мкл. Клетки инкубировали с реагентом MTS в течение 4 ч, после этого среду сверху и снизу отбирали и смешивали. 100 мкл раствора переносилось в 96-луночный планшет для определения оптической плотности при длине волны 490 нм (ОП₄₉₀) на приборе Spectra-max iD3 (Molecular Devices, США).

Покрывание культуральных вставок ламином 521

Для оценки влияния ламина 521 на клетки BeWo b30 мембранные вставки 96-луночных культуральных систем Corning HTS Transwell (Merck, США) площадью 0,143 см² покрывали рекомбинантным ламином 521 (Biolamina, Швеция). Стоковый раствор ламина с концентрацией 100 мкг/мл разводили до рабочей концентрации 10 мкг/мл с помощью раствора DPBS (ПанЭко) с содержанием ионов Ca²⁺ и Mg²⁺ (осмоляемость раствора 270–300 мОсм/л, что соответствует физиологическому значению). В каждую культуральную вставку наливали по 30 мкл рабочего раствора ламина 521 (около 2 мкг/см²), после чего вставки инкубировали 2 ч в клеточном инкубаторе при 37 °С. После этого раствор ламина удаляли и культуральные вставки трижды промывали с помощью DPBS.

Для контрольного эксперимента вместо раствора ламина использовался DPBS. После промывания культуральных вставок DPBS в них наливали 50 мкл культуральной среды, а в нижние камеры системы Transwell – по 235 мкл среды. Системы Transwell с культуральными вставками инкубировали в течение 1 ч в клеточном инкубаторе при 37 °С, после чего переходили к культивированию клеток.

Культивирование клеток и импедансная спектроскопия

Суспензию клеток BeWo b30 с концентрацией 400 тыс. кл./мл наливали в объеме 50 мкл в каждую культуральную вставку, уже содержащую 50 мкл среды (около 20000 клеток на каждую вставку или 140000 кл./см²). В процессе культивирования клеток замена среды производилась каждые 2–3 дня,

перед каждой заменой среды состояние клеток контролировалось с помощью прибора для импедансной спектроскопии (BioClinicum, Россия) в диапазоне частот от 20 до 20000 Гц как было описано ранее [9, 14]. На основе импедансных спектров рассчитывали значения фонового электрического сопротивления, трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) и электрической емкости клеток. Проверка значений TEER на нормальность распределения осуществлялась с помощью метода Колмогорова-Смирнова. Распределение значений не отличалось достоверно от нормального, поэтому для сравнения значений TEER использовался стандартный t-критерий Стьюдента.

Сравнительный полногеномный транскриптомный анализ

После культивирования клеток BeWo b30 на ламином 521 и пластике без внеклеточного матрикса был проведен сравнительный полногеномный транскриптомный анализ с помощью микрочипов Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США), как было описано ранее [15]. Для этого производили покрытие 24-луночного культурального планшета (Sigma, США) раствором ламина 521 в DPBS с содержанием ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, как описано выше, а в контрольных лунках производилось инкубирование с раствором DPBS. После этого клетки BeWo b30 высаживали в количестве 60000 кл./лунка и культивировались в течение 24 ч, чтобы исключить влияние таких факторов, как контактное взаимодействие, гипоксия и дефицит питательных веществ и выявить действие на клетки ламина 521.

После этого по три биологических повтора клеток на ламином 521 и на пластике без матрикса лизировали в 700 мкл Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Германия). Далее выделяли тотальную РНК с помощью набора реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen), как описано было ранее [16]. Определение концентрации РНК производилось с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 по ОП₂₆₀. Отношение ОП₂₆₀/ОП₂₈₀ для всех образцов >2 было показателем высокой чистоты выделенной РНК [17]. Все образцы РНК подвергались анализу качества с помощью прибора 2100 Bioanalyzer и набора реагентов RNA 6000 Nano Kit (Agilent, США) [18] и имели показатель качества RIN >7. Все стадии подготовки образцов для гибридизации на микрочипы Gene Chip Human Transcriptome Array 2.0 Affymetrix проводили так, как было описано ранее [19, 20]. Для синтеза кДНК использовали 500 нг тотальной РНК, выделенной из клеток. Гибридизацию, промывание,

окрашивание и сканирование микрочипов проводили так, по [21]. Сравнение экспрессии генов проводилось с помощью программы Transcriptome Analysis Console version 4.0.1.36 (Thermo Fisher Scientific) с использованием предобработки методом RMA [22, 23] и статистического метода eBayes. Достоверным считалось изменение экспрессии не менее чем в 1,5 раза при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методы контроля количества клеток

Анализ корреляции количества клеток и концентрации двухцепочечной ДНК в лизатах, полученных с помощью додецилсульфата натрия, показал линейную зависимость только до 80 тыс. клеток, после чего значения концентраций ДНК постепенно выходят на плато (рис. 1), что может свидетельствовать о неэффективности лизирования большего количества клеток или неэффективности набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit при таком количестве нефрагментированной геномной двухцепочечной ДНК.

Анализ корреляции результатов MTS-теста и количества клеток также показал, что линейность метода сохраняется до 80 тыс. клеток, после чего значения поглощения при 490 нм выходят на плато (рис. 2). При этом коэффициент линейной аппроксимации был выше для метода на основе MTS-теста, кроме того, клетки после данного теста оставались жизнеспособными и могли быть использованы для других экспериментов, поэтому данный метод был выбран в качестве предпочтительного для контроля количества клеток BeWo b30 при культивировании на мембранных вставках Transwell.

Результаты импедансной спектроскопии при культивировании клеток на ламинине 521

Первое измерение импедансного спектра производилось через три дня после посадки клеток BeWo b30 на культуральные вставки Transwell с различными покрытиями. Для клеток на ламинине 521 и без внеклеточного матрикса годограф импеданса принял характерную форму полуокружности, что указывает на формирование монослоя клеток; были рассчитаны значения TEER и электрической емкости. На 5-й день клетки на ламинине 521 и без внеклеточного матрикса не отличались значимо по значению TEER, однако к 10-му дню показатель TEER клеток на ламинине 521 вышел на плато, а без матрикса продолжил расти (рис. 3).

Ранее было показано, что ламинины, содержащие $\alpha 5$ -цепь, способствуют дифференцировке клеток [4]. Электрическая емкость клеток может отражать изменение поверхности клеток при

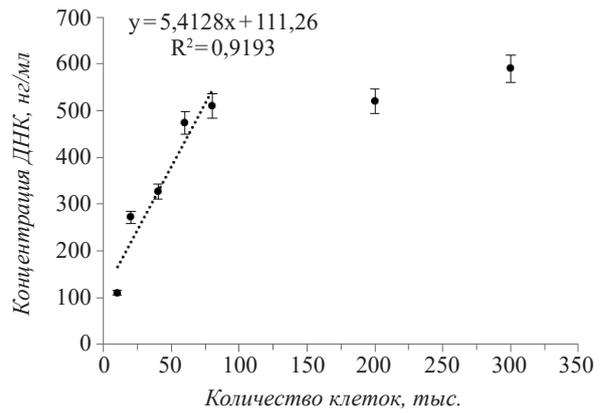


Рис. 1. Зависимость концентрации ДНК, определенной с помощью Qubit dsDNA HS Assay Kit, от количества клеток BeWo b30

Fig. 1. Dependence of the DNA concentration determined by Qubit dsDNA HS Assay Kit on the number of BeWo b30 cells

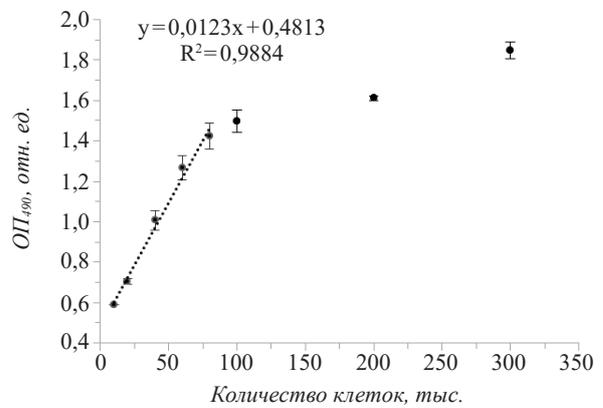


Рис. 2. Зависимость ОП₄₉₀ среды после 4 ч инкубации клеток с реагентом MTS от количества клеток BeWo b30

Fig. 2. Dependence of the medium OD₄₉₀ after 4 h of incubation of cells with the MTS reagent on the number of BeWo b30 cells

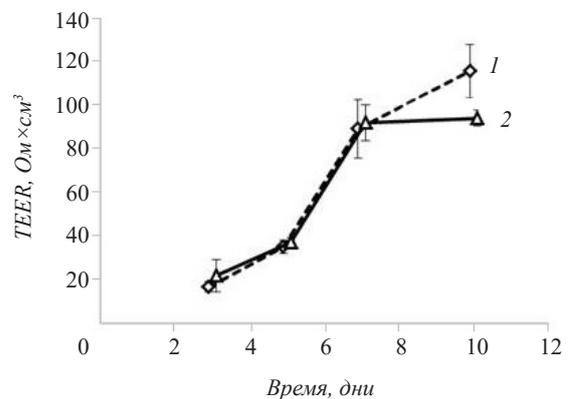


Рис. 3. Изменение трансэпителиального электрического сопротивления (TEER) с течением времени при росте клеток BeWo b30 без внеклеточного матрикса (1) и на матриксе с ламинином (2)

Fig. 3. Change in transepithelial electrical resistance (TEER) over time during the growth of BeWo b30 cells on plastic without extracellular matrix (1) and on laminin 521 (2)

дифференцировке, например, образование микроворсинок или иные преобразования мембраны [24]. Емкость клеток на ламинине 521 на 5-й день была ниже, чем у клеток без внеклеточного матрикса, а начиная с 7-го дня емкость стала выходить на плато, при этом значения емкости были выше для клеток без ламинина, чем на ламинине 521 (рис. 4). Эти данные также согласуются с ролью ламинина 521 в развитии плаценты [4].

Результаты сравнительного полногеномного транскриптомного анализа

Поскольку клетки на ламинине 521 вплоть до 7-го дня были неотличимы по значениям TEER от клеток без внеклеточного матрикса, но отличались по значениям электрической емкости, было решено сравнить профили экспрессии генов данных клеток. Различия в экспрессии при снижении контактного взаимодействия клеток и возможной гипоксии и дефицита питательных веществ при длительном культивировании были минимальными: в клетках на ламинине 521 была достоверно снижена экспрессия 39 и повышена экспрессия 75 кодирующих транскрипционных кластеров. Однако среди всех этих кластеров аннотированными в базе данных Affymetrix оказались всего лишь 10 кластеров. Список закодированных в них генов и изменения их экспрессии приведены в табл. 1.

Из представленных генов один является псевдогеном (*TECRP1*), нефункциональным аналогом гена *TECR*, кодирующего транс-2,3-еноил-КоА-редуктазу, фермент метаболизма жирных кислот. Еще пять генов кодируют пре-микроРНК для микроРНК *hsa-miR-3668*, *hsa-miR-3942-5p*, *hsa-miR-3942-3p*, *hsa-miR-623*, *hsa-miR-578* и *hsa-miR-3143*, изменение уровня которых может вы-

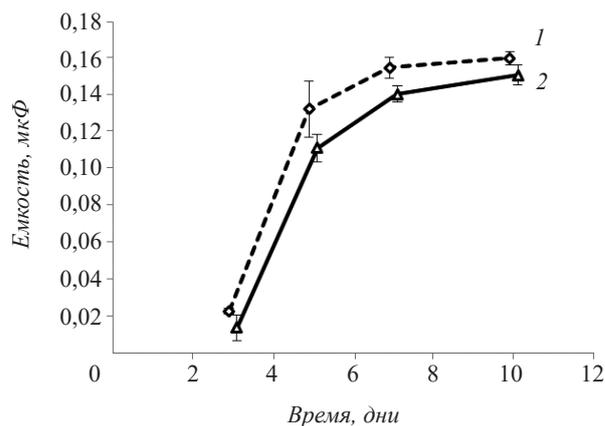


Рис. 4. Изменение электрической емкости с течением времени при росте клеток BeWo b30 без внеклеточного матрикса (1) и на матриксе с ламинином (2)

Fig. 4. Change in electrical capacitance over time during the growth of BeWo b30 cells on plastic without extracellular matrix (1) and on laminin 521 (2)

зывать изменение экспрессии их генов-мишеней [25, 26]. Один ген кодирует малую ядрышковую РНК *SNORD75*. Два гена кодируют транскрипционные факторы *SNAIL1* и *ZNF708*: экспрессия гена *SNAIL1* в клетках BeWo b30 на ламинине 521 повышена, а гена *ZNF708* – понижена.

Было показано, что экспрессия гена *SNAIL1*, являющегося ключевым регулятором эпителиально-мезенхимального перехода, повышается в клетках BeWo при синцитиализации, то есть слиянии клеток цитотрофобласта с образованием синцитиотрофобласта [27]. Кроме того, в клетках BeWo b30, схожих с барьерным цитотрофобластом, экспрессия *SNAIL1* была выше, чем в клетках HTR8/SVneo, похожих на высокоинвазивный вневорсинчатый трофобласт [28].

Таблица 1

Различия в экспрессии генов клеток BeWo b30 при культивировании на пластике без внеклеточного матрикса и на ламинине-521

Gene expression differences in BeWo b30 cells during cultivation on plastic without extracellular matrix and on laminin-521

Ген	Экспрессия клеток BeWo b30, log ₂ -ед.		Кратность различий (линейная)	Уровень значимости (p)
	на ламинине 521	без матрикса		
<i>MIR3668</i>	9,7	9,0	1,7	0,005
<i>SNAIL1</i>	6,4	5,7	1,7	0,034
<i>TECRP1</i>	12,5	11,8	1,6	< 0,001
<i>MIR3942</i>	7,5	6,9	1,5	0,031
<i>GRN</i>	10,8	10,2	1,5	0,002
<i>SNORD75</i>	11,2	10,7	1,5	0,019
<i>MIR623</i>	5,9	5,4	1,5	0,025
<i>ZNF708</i>	11,0	11,5	-1,5	0,007
<i>MIR578</i>	3,9	4,7	-1,7	0,001
<i>MIR3143</i>	8,3	10,3	-4,2	< 0,001

Экспрессия гена *GRN*, кодирующего секреторный гликопротеин (програнулин), стимулирует деление клеток BeWo и так же выше в синцитиотрофобласте, чем в цитотрофобласте [29]. Возможно, наблюдаемое нами изменение экспрессии генов *SNAI1* и *GRN* на ламинине 521 свидетельствует о подготовке клеток BeWo b30 к слиянию в синцитиотрофобласт, что согласуется с наблюдаемым понижением TEER на 10-й день в клетках на ламинине 521 по сравнению с клетками на пластике без покрытия. В то же время функция транскрипционного фактора ZNF708 в трофобласте на данный момент остается неизученной, а изменение экспрессии, кодирующих его генов в данных клетках, описано нами впервые.

Таким образом, в данной работе MTS-тест был показан как оптимальный способ контроля количества клеток BeWo b30 при росте на вставках Transwell. Было отмечено влияние ламинина 521 на импедансный спектр и электрические показатели монослоя клеток BeWo b30 как модели плацентарного барьера *in vitro*, в частности, были отмечены характерные различия в TEER и электрической емкости клеток при росте без внеклеточного матрикса и на ламинине 521. Анализ транскриптома клеток на пластике без внеклеточного матрикса и при наличии покрытия ламинином 521 показал изменение экспрессии генов *SNAI1*, *ZNF708* и *GRN*. Наблюдаемые изменения могут свидетельствовать о подготовке клеток на ламинине 521 к слиянию в синцитиотрофобласт, что указывает на более физиологичные условия при добавлении внеклеточного матрикса в модель плацентарного барьера на основе клеток BeWo b30.

При выполнении работы было использовано оборудование ЦКП «Постгеномные и метаболомные методы исследования в молекулярной биологии» на базе ООО НТЦ «БиоКлиникум».

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (№ RFMEFI58817X0007).

ЛИТЕРАТУРА

1. Knyazev E.N., Mal'tseva D.V., Zacharyants A.A., et al. TNF α -Induced Expression of Transport Protein Genes in HUVEC cells is associated with enhanced expression of transcription factor genes RELB and NFKB2 of the non-canonical NF- κ B pathway. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 164, 757–761.
2. Domogatskaya A., Rodin S., Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012, 28, 523–553.
3. Maltseva D.V., Rodin S.A. Laminins in metastatic cancer. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 350–371.
4. Spenlé C., Simon-Assmann P., Orend G., Miner J.H. Laminin α 5 guides tissue patterning and organogenesis. *Cell Adh. Migr.*, 2013, 7, 90–100.
5. Zakhariants A.A., Burmistrova O.A., Shkurnikov M.Y., et al. Development of a Specific Substrate-Inhibitor Panel (Liver-on-a-Chip) for Evaluation of Cytochrome P450 Activity. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 162, 170–174.
6. Zakharyants A.A., Burmistrova O.A., Poloznikov A.A. The use of human liver cell model and cytochrome P450 substrate-inhibitor panel for studies of dasatinib and warfarin interactions. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, 162, 515–519.
7. Sakharov D., Maltseva D., Knyazev E., 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.*, 2019, 13, 19.
8. Blundell C., Yi Y.-S., Ma L., et al. Placental drug transport-on-a-chip: A microengineered *in vitro* model of transporter-mediated drug efflux in the human placental barrier. *Adv. Healthc. Mater.*, 2018, 7, 1700786.
9. Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., Impedance spectroscopy and transcriptome analysis of choriocarcinoma BeWo b30 as a model of human placenta. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 411–418.
10. Samatov T.R., Senyavina N. V., Galatenko V. V., et al. Tumour-like druggable gene expression pattern of CaCo2 cells in microfluidic chip. *BioChip J.*, 2016, 10, 215–220.
11. Mal'tseva D.V., Makarova Y.A., Raigorodskaya M.P., Rodin S.A. Effects of laminins 332 and 411 on the epithelial–mesenchymal status of colorectal cancer cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 377–382.
12. Maltseva D.V., Makarova J.A., Khristichenko A.Y., et al. Rodin S.A. Epithelial to mesenchymal transition marker in 2D and 3D colon cancer cell cultures in the presence of laminin 332 and 411. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 291–298.
13. Doi M., Thyboll J., Kortessmaa J., et al. Recombinant human laminin-10 (α 5 β 1 γ 1). Production, purification, and migration-promoting activity on vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 12741–12748.
14. Nikulin S.V., Mnaifi N.A., Shilin S.A., et al. Ribosome inactivation and the integrity of the intestinal epithelial barrier. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 583–589.
15. Knyazev E.N., Nyushko K.M., Alekseev B.Y., et al. Suppression of ITGB4 gene expression in pc-3 cells with short interfering rna induces changes in the expression of β -integrins associated with RGD-Receptors. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2015, 159, 541–545.
16. Rudimov E.G., Knjazev E.N., Khaustova N.A., et al. Transcriptomic changes in human umbilical cord blood endothelial cells under simulated microgravity. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, 472, 1–4.
17. Fomicheva K.A., Osip'yants A.I., Knyazev E.N., et al. Detection of potential metastatic prostate cancer circulating biomarkers by comparison of miRNA profiles in DU145 cells and culture medium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2017, 162, 792–796.

18. Krainova N.A., Khaustova N.A., Makeeva D.S., et al. Evaluation of potential reference genes for qRT-PCR data normalization in HeLa cells. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2013, 49, 743–749.
19. Khaustova N.A., Maltseva D. V., Oliveira-Ferrer L., et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie.*, 2017, 142, 197–206.
20. Kudriaeva A., Galatenko V., Maltseva D., et al. The Transcriptome of type I murine astrocytes under interferon-gamma exposure and remyelination stimulus. *Molecules.*, 2017, 22, 808.
21. Sakharov D.A., Maltseva D.V., Riabenko E.A., et al. Passing the anaerobic threshold is associated with substantial changes in the gene expression profile in white blood cells. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 2012, 112.
22. Shkurnikov M.Y., Knyazev E.N., Wicklein D., et al. Role of L1CAM in the Regulation of the Canonical Wnt Pathway and Class I MAGE Genes. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 160, 807–810.
23. Galatenko V. V., Shkurnikov M.Y., Samatov T.R., et al. Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 14967.
24. Nikulin S. V., Knyazev E.N., Poloznikov A.A., et al. Expression of SLC30A10 and SLC23A3 Transporter mRNAs in Caco-2 Cells Correlates with an Increase in the Area of the Apical Membrane. *Mol. Biol.*, 2018, 52, 577–582.
25. Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Turchinovich A.A., et al. Circulating microRNAs. *Biochem.*, 2015, 80, 1117–1126.
26. Makarova J.A., Maltseva D. V., Galatenko V. V. et al. Exercise immunology meets miRNAs. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2014, 20, 135–64.
27. Butler T.M., Pater J.A., MacPhee D.J. Integrin linked kinase regulates syncytialization of BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 2017, 96, 673–685.
28. Chen Y., Wang K., Qian C.-N., Leach R. DNA methylation is associated with transcription of Snail and Slug genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 430, 1083–1090.
29. Stubert J., Richter D.-U., Gerber B., Briese V. Expression pattern of progranulin in the human placenta and its effect on cell proliferation in the choriocarcinoma cell line BeWo. *J. Reprod. Dev.*, 2011, 57, 229–35.

Laminin 521 Alters the *SNAIL*, *ZNF708* and *GRN* Gene Expression in BeWo b30 Cells and Creates Physiological Conditions for the Placental Barrier

E.A. KNYAZEVA¹, E.N. KNYAZEV^{1,2,3,*}, T.N. GERASIMENKO¹, O.V. KINDEEVA^{1,3}, D.V. MALTSEVA^{1,2}, A. TURCHINOVICH^{4,5}, and A.A. SERGIEVICH³

¹BioClinicum Scientific Research Center, Moscow, 115088 Russia

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117998 Russia

³Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia

⁴SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany

⁵Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120 Germany

*e-mail: e.knyazev@bioclinicum.ru

Received September 19, 2019

Revised September 30, 2019

Accepted October 16, 2019

Abstract—A human choriocarcinoma cell line BeWo b30 imitates cytotrophoblast cells and thus allows to model the placental barrier. Since these cells can form multilayered structures, a method to control the number of cells based on the MTS test has been developed. It was found that during the cell growth on a laminin-521-containing extracellular matrix a significant change in the transepithelial electrical resistance (TEER) and the electrical capacitance of the cell monolayer is observed as compared to the cultivation without the extracellular matrix. The transcriptome analysis of the cells revealed that in the presence of laminin-521, the expression of the *ZNF708* gene decreases and that of the *SNAIL* and progranulin gene *GRN* increases as compared to the data obtained without the extracellular matrix. This may indicate that in the first case the cells were prepared to fuse into syncytiotrophoblast. A change in the expression of five microRNA genes and one snoRNA gene was also observed. The above mentioned effects can be associated with the used laminin.

Keywords: BeWo b30, placenta, barrier, microRNA, laminin 521 (laminin-11), *SNAIL*

Funding—The study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of the Federal Targeted Program for Research and Development in Priority Areas of Advancement of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020 (RFMEFI58817X0007).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-87-93

Рег. № 1306 от 28.06.99
Выдано Госкомпечать России

Издатель: Федеральное государственное бюджетное учреждение Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика)
117545, Москва, 1-ый Дорожный проезд, д. 1

Редактор Е.В. Терашкевич. Компьютерная верстка Е.А. Овчинникова

Подписано в печать 15.10.2019 г. Формат бумаги 90 × 60
Бумага офсетная. Офсетная печать. Печ. л. 11. Уч.-изд. л. 11,1. Тираж 130 экз.

Заказ № 2576

Отпечатано с готового оригинала-макета в типографии Book Jet
390005, г. Рязань, ул. Пушкина, д. 18