

УДК 576.5, 57.085.2

Активация HIF-1 α снижает экспрессию гена-хозяина микроРНК hsa-miR-603 *KIAA1217* и повышает экспрессию гена-мишени *CCND1* в клетках BeWo b30

© 2019 Е. Н. КНЯЗЕВ^{1,2,3,*}, Е. А. КНЯЗЕВА¹, С. В. НИКУЛИН^{1,3}, А. Ю. ХРИСТИЧЕНКО¹, В. А. ПЕТРОВ^{1,4}, А. ТУРЧИНОВИЧ^{5,6}, 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

⁴ФГБУН Институт нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук, Москва, 115487

⁵SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309, Germany

⁶Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120, Germany

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

Поступила в редакцию 19.09.2019 г.

После доработки 05.10.2019 г.

Принята к публикации 13.10.2019 г.

В модели плацентарного барьера на основе клеточной линии хориокарциномы человека BeWo b30 изучено влияние производного оксихинолина – ингибитора HIF-пролилгидроксилаз. Ингибирование этих ферментов приводит к повышению в цитоплазме клеток субъединицы HIF-1 α , что имитирует ответ клеток на гипоксию. Воздействие препарата в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч не влияло на параклеточный транспорт, но снижало транспорт глюкозы через клеточный барьер. При анализе транскриптома было выявлено, что при воздействии производного оксихинолина снижается экспрессия гена *KIAA1217* и лежащего в его интроне гена *MIR603*, который кодирует микроРНК has-miR-603. Экспрессия гена-мишени этой микроРНК – *CCND1*, кодирующего циклин D1, – при воздействии производного оксихинолина достоверно повышается, что может указывать на потенциальный регуляторный механизм микроРНК–мРНК при реакции клеток трофобласта на гипоксию.

Ключевые слова: BeWo b30, плацента, гипоксия, оксихинолин, барьер, микроРНК, циклин

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-80-86

Плацента представляет собой барьерный орган, разделяющий кровотоки матери и плода во время беременности. Она регулирует транспорт газов, питательных веществ и продуктов обмена, а также лекарственных препаратов и токсических веществ. После имплантации эмбриона в стенку матки матери в процессе формирования плаценты

из хориона постепенно образуются ворсинки, покрытые снаружи клетками трофобласта и содержащими внутри сосуды ребенка. Ворсинки омываются снаружи кровью матери, и плацентарный барьер, по сути, представляет собой два слоя клеток – трофобласт и эндотелий ребенка, – разделенных слившимися базальными мембранами этих

Список сокращений: ДМСО – диметилсульфоксид; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; FBS (fetal bovine serum) – эмбриональная телячья сыворотка; FITC (fluorescein isothiocyanate) – изотиоцианат флуоресцеина; FDR *p* (false discovery rate) – *p*-значение с поправкой Бенджамини-Хохберга; HIF (hypoxia-inducible factor) – фактор, индуцируемый гипоксией; TEER (transepithelial electrical resistance) – трансэпителиальное электрическое сопротивление.

клеток. Многие патологические процессы могут приводить к нарушению функций плацентарного барьера, нанося вред ребенку и матери [1].

Преэклампсия является одним из самых распространенных заболеваний при беременности. Патогенез преэклампсии связан в том числе с гипоксией плацентарного барьера, что приводит к активации индуцируемого гипоксией фактора (HIF)-1 α и нарушениям работы плацентарного барьера. На ранних этапах развития плаценты трофобласт находится в состоянии физиологической гипоксии, приводящей к запрограммированным изменениям в клетках, однако в сформированном плацентарном барьере гипоксия характерна только для патологических состояний [1]. Изучение роли гипоксии и активации HIF-1 α в трофобласте позволяет лучше понять патогенез нарушений проницаемости барьера и возможные способы противодействия этим процессам.

Для изучения плацентарного барьера часто используют клеточные модели *in vitro* на основе человеческих клеток. В частности, для моделирования трофобласта наиболее часто используют линию хориокарциномы человека BeWo b30, которая при росте на проницаемых мембранах приобретает свойства цитотрофобласта и образует полноценный клеточный барьер. Такие модели характеризуются хорошей воспроизводимостью, относительно невысокой стоимостью и простотой в работе, а использование внеклеточного матрикса и микробиореакторов с циркулирующей среды позволяет приблизить микроокружение клеток к естественным условиям [2].

Изучение эффектов гипоксии на клеточных моделях широко распространено. Молекулярный механизм ответа клеток на гипоксию предполагает активацию HIF. Этот белковый комплекс состоит из конститутивной субъединицы HIF- β и регуляторной α -субъединицы (HIF-1 α , HIF-2 α или HIF-3 α). Гипоксия приводит к снижению активности HIF-пролилгидроксилаз, что в свою очередь приводит к накоплению в цитоплазме клеток α -субъединицы HIF [3]. При изучении гипоксии на клеточных моделях плацентарного барьера используют способ непосредственного снижения уровня кислорода во время культивирования клеток или косвенный, например, за счет химической активации гипоксического пути, что приводит к изменениям сигнального пути HIF [1]. В частности, ранее показано, что производные оксигинолина с различными заместителями могут ингибировать HIF-пролилгидроксилазы за счет взаимодействия с их активными центрами, что приводит к накоплению в цитоплазме HIF- α и активации целого ряда генов-мишеней, связанных с эффектами гипоксии [4, 5]. Одним из возможных механизмов проявле-

ния эффектов гипоксии является выделение клетками плацентарного барьера молекул микроРНК, способных регулировать экспрессию генов клеток на посттранскрипционном уровне за счет связывания с целевыми молекулами мРНК [6, 7].

Цель работы – исследование влияния производного оксигинолина на модель плацентарного барьера *in vitro* на основе клеток BeWo b30 как потенциального способа активации гипоксического ответа в трофобласте и установление возможных взаимодействий мРНК–микроРНК в ответ на активацию HIF-1 α .

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материал

Клетки BeWo (клон b30) были любезно предоставлены Prof. Christiana Albrecht (University of Bern, Switzerland) с разрешения Dr. Alan Schwartz (Washington University in St. Louis, USA). Клетки культивировали в среде Gibco DMEM без L-глутамина и пирувата с содержанием 4,5 г/л глюкозы (Thermo Fischer Scientific, США) с добавлением 10% FBS Gibco One Shot (Thermo Fischer Scientific), 2 mM L-глутамина («ПанЭко», Россия), 1 \times заменимых аминокислот Gibco MEM NEAA (Thermo Fischer Scientific) и 1 \times раствора Gibco PenStrep, содержащего 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Thermo Fischer Scientific). Культивирование клеток проводили при 37 °C и 5% CO₂. В экспериментах использовали клетки не выше 35-го пассажа.

Обработка клеток производным оксигинолина

Клетки высевали с плотностью 210000/см² (30000 клеток на лунку) в полиэфирные культуральные вставки площадью 0,143 см² с порами 1 мкм 96-луночных систем Corning Transwell (Merck, США). Клеточная среда заменялась ежедневно в рекомендуемом объеме (75 мкл сверху и 235 мкл снизу). Для оценки состояния плацентарного барьера перед заменой среды измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление (TEER), как описано ранее в [8, 9].

Через двое суток после посева проводили эксперимент с производным оксигинолина. Для этого при замене среды в верхнюю камеру добавляли 75 мкл среды, содержащей раствор 10 мкМ производного оксигинолина в ДМСО (финальная концентрация ДМСО 2%). В контрольных экспериментах в верхнюю камеру добавляли 75 мкл среды, содержащей 2% ДМСО без оксигинолина. Величину TEER измеряли через 6 и 24 ч после добавления производного оксигинолина.

Анализ проницаемости барьера

Для оценки состоятельности монослоя после инкубации с производным оксихинолина оценивали барьерную функцию по проницаемости для глюкозы и FITC-декстрана (M_r 70 кДа). Среду в верхней и нижней камере заменяли в рекомендуемых объемах, при этом среда в верхней камере содержала 1 г/л FITC-декстрана с массой 70 кДа. Через 2 ч производили отбор среды и анализировали количество FITC-декстрана, прошедшего сквозь клеточный барьер. Для этого определяли флуоресценцию при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны излучения 535 нм на приборе SpectraMax i3 (Molecular Devices, США). Концентрацию FITC-декстрана определяли по калибровочной прямой.

После оценки проницаемости для FITC-декстрана проводили замену среды в верхней и нижней камерах в рекомендуемом объеме. При этом в нижнюю камеру системы Transwell добавляли среду DMEM с низким содержанием глюкозы (1 г/л), а в верхнюю камеру – ту же среду с 4,5 г/л глюкозы (добавляя стерильный раствор D-(+)-глюкозы (Sigma-Aldrich, США)). После 1 ч инкубации при 37 °С в клеточном CO₂-инкубаторе среду отбирали и определяли в ней концентрацию глюкозы. К 10 мкл среды из нижних камер добавляли 990 мкл реагента Glucose LiquiColor (Human GmbH, Германия). Смесь инкубировали на водяной бане при 37 °С в течение 5 мин, после чего 200 мкл каждого образца переносили в 96-луночный планшет и анализировали оптическую плотность при длине волны 500 нм. Концентрацию глюкозы определяли относительно стандартного образца с концентрацией глюкозы 1 г/л.

Выделение РНК

После экспериментов по проницаемости мембраны с клетками аккуратно отделяли от культуральных вставок и помещали в 1,5-мл пробирки, содержащие 700 мкл Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Германия). В каждую пробирку добавляли по 9 мембран с клетками, по 3 повтора на каждое условие эксперимента. Выделение РНК проводили с добавлением GlycoBlue Coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) для повышения выхода totalной РНК [10] с использованием набора реагентов miRNeasy Micro Kit (Qiagen), как описано ранее [11]. Концентрацию РНК определяли на приборе NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) [12]. Качество образцов РНК анализировали с помощью прибора 2100 Bioanalyzer и набора реагентов RNA 6000 Nano Kit (Agilent, США) [13]. Все образцы имели показатель качества RIN более 9,5.

Транскриптомный анализ на микрочипах

Для транскриптомного анализа с помощью микрочипов Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix, США) использовали 500 нг totalной РНК, выделенной из каждого клеточного лизата, как описано ранее [14, 15]. Гибридизацию, промывание, окрашивание и сканирование микрочипов проводили, как описано ранее [16]. Для нормирования и анализа результатов измерения экспрессии использовали программу Transcriptome Analysis Console version 4.0.1.36 (Thermo Fisher Scientific) с подготовкой методом RMA [17, 18] и статистический метод eBayes. Достоверным считали изменение экспрессии не менее чем в 2 раза при FDR $p < 0,01$.

Значения проницаемости для глюкозы и FITC-декстрана оценивали на нормальность распределения с помощью метода Колмогорова-Смирнова. Распределение значений не отличалось достоверно от нормального, поэтому для сравнения значений проницаемости использовали стандартный t -критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах по оценке проницаемости клеток показано, что через 24 ч инкубации клеток с производным оксихинолина и без препарата проницаемость для FITC-декстрана с M_r 70 кДа составляла $1,9 \pm 0,8$ и $1,9 \pm 1,6\%$ соответственно. Это указывает на одинаковую степень целостности межклеточных контактов и отсутствие выраженного повреждения или гибели клеток. В то же время проницаемость для глюкозы после инкубации с производным оксихинолина и без препарата составила 9 ± 3 и $13 \pm 3\%$ соответственно ($p < 0,05$). Этот эффект может быть обусловлен метаболическим перепрограммированием трофобласта при активации HIF-1 α , что выражается в переходе от аэробного к анаэробному метаболизму и сочетается с повышенным потреблением глюкозы, но пониженным потреблением кислорода. Данный механизм позволяет плаценте в условиях гипоксии транспортировать в кровь плода достаточное количество кислорода [19].

Проведено сравнение транскриптомов клеток, обработанных и не обработанных производным оксихинолина. Известно, что гены некоторых микроРНК располагаются в интронах других генов, называемых генами-хозяевами, и после процессинга транскрибируемых с них пре-мРНК из удаленных интронов образуются пре-микроРНК [20]. В связи с этим повышение экспрессии гена-хозяина часто может быть связано с повышением экспрессии закодированной в нем микроРНК. В свою очередь повышение

уровня микроРНК в клетке приводит к снижению экспрессии мРНК генов-мишеней этих микроРНК [21]. Проанализированы изменения экспрессии генов, несущих в своих интронах микроРНК, и экспрессии генов-мишеней этих микроРНК. При воздействии производного оксихинолина на клетки BeWo b30 отмечали достоверное изменение экспрессии 66 генов, несущих в своих интронах микроРНК (табл. 1), что теоретически может приводить к изменению экспрессии указанных пре-микроРНК. Микрочипы GeneChip HTA 2.0 позволяют анализировать экспрессию генов микроРНК, однако часть проб к генам микроРНК дает перекрестный сигнал с другими мРНК, поэтому невозможно отличить повышение

экспрессии пре-микроРНК от экспрессии мРНК. Среди 66 интронных микроРНК (табл. 1) только 36 микроРНК можно было отличить от мРНК по экспрессии на микрочипах GeneChip HTA 2.0. Из них для 25 генов микроРНК направленность изменения экспрессии совпадала с направленностью изменения экспрессии гена-хозяина, при этом только для 12 генов микроРНК *p*-значение без поправки на множественность сравнений было менее 0,05, а FDR *p*-значение было меньше 0,05 для 4 генов: *MIR4451*, *MIR616*, *MIR3189* и *MIR603*, которые расположены в интронах генов *ARHGAP24*, *DDIT3*, *GDF15* и *KIAA1217* и кодируют соответственно пре-микроРНК *hsa-mir-4451*, *hsa-mir-616*, *hsa-mir-3189* и *hsa-mir-603*.

Таблица 1

Гены-хозяева интронных микроРНК, экспрессия которых достоверно изменялась при воздействии производного оксихинолина

Host genes of intronic miRNAs with significant expression change after exposition to the derivative of oxyquinoline

Ген	Экспрессия гена (log ₂)		Кратность изменения экспрессии (log ₂)*	FDR <i>p</i>	Кодируемая пре-микроРНК
	в присутствии производного оксихинолина	в отсутствие производного оксихинолина			
<i>AFTPH</i>	11,8	10,7	1,0	0,001	hsa-mir-4434
<i>AIP</i>	8,3	6,2	2,0	0,002	hsa-mir-6752
<i>AMOTL2</i>	9,6	8,3	1,4	0,001	hsa-mir-6827
<i>ANAPC1</i>	11,1	12,1	-1,0	0,001	hsa-mir-4771-2
<i>ANP32A</i>	10,2	11,3	-1,1	<0,001	hsa-mir-4312
<i>ARHGAP24</i>	5,6	6,7	-1,0	0,001	hsa-mir-4451
<i>ARL15</i>	7,5	8,6	-1,2	0,005	hsa-mir-4459
<i>ARL15</i>	7,5	8,6	-1,2	0,005	hsa-mir-581
<i>CCNF</i>	6,8	8,1	-1,4	0,001	hsa-mir-6767
<i>CDC73</i>	13,1	12,0	1,1	0,001	hsa-mir-1278
<i>CLU</i>	10,0	7,1	2,9	<0,001	hsa-mir-6843
<i>CNNM4</i>	9,7	8,4	1,3	0,001	hsa-mir-3127
<i>COPG1</i>	12,0	10,8	1,2	0,001	hsa-mir-6826
<i>DAPK3</i>	8,3	7,1	1,2	<0,001	hsa-mir-637
<i>DCAF6</i>	11,5	12,5	-1,0	<0,001	hsa-mir-1255b-2
<i>DDIT3</i>	10,6	7,7	2,9	<0,001	hsa-mir-616
<i>DICER1</i>	10,2	11,2	-1,1	0,007	hsa-mir-3173
<i>ELMO1</i>	7,6	8,8	-1,2	0,003	hsa-mir-1200
<i>FAT2</i>	8,6	10,1	-1,5	0,001	hsa-mir-6499
<i>FKBP1A</i>	9,5	10,5	-1,0	0,007	hsa-mir-6869
<i>FLVCR2</i>	10,9	12,6	-1,7	0,001	hsa-mir-7641-2
<i>FUT8</i>	10,8	11,9	-1,1	0,001	hsa-mir-625
<i>FXYP3</i>	7,0	8,0	-1,0	0,004	hsa-mir-6887
<i>GALNT1</i>	11,0	12,6	-1,6	<0,001	hsa-mir-3975
<i>GDF15</i>	13,1	10,9	2,2	0,001	hsa-mir-3189
<i>GOLGA8A</i>	10,9	9,2	1,7	0,001	hsa-mir-1233-1
<i>GOLGA8B</i>	10,6	9,0	1,7	0,001	hsa-mir-1233-2
<i>ISOC1</i>	9,9	10,9	-1,0	0,001	hsa-mir-4633
<i>KAT2B</i>	10,1	11,5	-1,4	<0,001	hsa-mir-3135a
<i>KIAA0430</i>	11,4	10,1	1,3	<0,001	hsa-mir-6506

Таблица 1 (Окончание)

Ген	Экспрессия гена (log ₂)		Кратность изменения экспрессии (log ₂)*	FDR <i>p</i>	Кодируемая пре-микроРНК
	в присутствии производного оксихинолина	в отсутствие производного оксихинолина			
<i>KIAA1217</i>	10,6	12,2	-1,6	<0,001	hsa-mir-603
<i>KIF18B</i>	6,8	7,9	-1,1	0,001	hsa-mir-6783
<i>KRIT1</i>	10,4	11,6	-1,2	0,002	hsa-mir-1285-1
<i>MCPH1</i>	7,5	6,5	1,0	0,001	hsa-mir-8055
<i>MED13L</i>	14,7	13,4	1,3	<0,001	hsa-mir-620
<i>MGAT5</i>	7,2	8,5	-1,2	0,001	hsa-mir-3679
<i>MTMR3</i>	9,7	8,6	1,1	0,002	hsa-mir-6818
<i>MYLIP</i>	12,3	10,2	2,1	0,001	hsa-mir-4639
<i>MYO1E</i>	12,8	13,9	-1,1	0,001	hsa-mir-2116
<i>NAV2</i>	8,4	9,7	-1,3	<0,001	hsa-mir-4486
<i>NAV2</i>	8,4	9,7	-1,3	<0,001	hsa-mir-4694
<i>NR2F2</i>	7,2	8,3	-1,1	0,003	hsa-mir-1469
<i>NXF1</i>	13,8	11,9	1,8	<0,001	hsa-mir-6514
<i>PDZD2</i>	7,7	9,4	-1,7	<0,001	hsa-mir-4279
<i>PER1</i>	7,2	5,7	1,5	0,001	hsa-mir-6883
<i>PFKFB3</i>	10,1	7,7	2,4	0,001	hsa-mir-3155a
<i>PFKFB3</i>	10,1	7,7	2,4	0,001	hsa-mir-3155b
<i>PITPNC1</i>	9,6	8,1	1,5	0,001	hsa-mir-548aa-2
<i>PITPNC1</i>	9,6	8,1	1,5	0,001	hsa-mir-548d-2
<i>PPARGC1B</i>	6,3	7,7	-1,4	0,001	hsa-mir-378a
<i>PRRC2A</i>	8,5	6,8	1,7	0,005	hsa-mir-6832
<i>PTPN3</i>	10,4	11,5	-1,1	0,001	hsa-mir-3927
<i>SCARA3</i>	10,0	11,8	-1,7	0,001	hsa-mir-3622a
<i>SCARA3</i>	10,0	11,8	-1,7	0,001	hsa-mir-3622b
<i>SKA2</i>	10,9	12,3	-1,4	0,001	hsa-mir-301a
<i>SKA2</i>	10,9	12,3	-1,4	0,001	hsa-mir-454
<i>SLC25A15</i>	8,0	9,0	-1,1	0,001	hsa-mir-621
<i>STMN1</i>	13,4	14,6	-1,2	0,001	hsa-mir-3917
<i>TNKS</i>	10,1	9,1	1,0	<0,001	hsa-mir-597
<i>TOM1</i>	10,9	9,1	1,8	0,001	hsa-mir-3909
<i>TOM1</i>	10,9	9,1	1,8	0,001	hsa-mir-6069
<i>TP63</i>	6,2	7,7	-1,5	<0,001	hsa-mir-944
<i>TTF2</i>	8,5	9,8	-1,3	0,001	hsa-mir-942
<i>UBTF</i>	10,2	11,6	-1,3	<0,001	hsa-mir-6782
<i>UGCG</i>	8,0	6,5	1,5	0,001	hsa-mir-4668
<i>UROS</i>	6,6	7,8	-1,2	0,001	hsa-mir-4484

*Знак минус указывает на снижение экспрессии гена при обработке клеток производным оксихинолина.

*A negative number means a decrease in gene expression when treating cells with the oxyquinoline derivative.

Для 66 микроРНК, закодированных в интронах генов, экспрессия которых достоверно изменилась при воздействии производного оксихинолина, была проанализирована экспрессия их генов-мишеней из базы данных miRTarBase 7.0 [22]. В расчет брали только функциональные взаимодействия микроРНК и мРНК, экспериментально подтвержденные с помощью иммуноблоттинга, анализа репортерного гена люциферазы или анализа репортерного гена зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Из всех генов-мишеней

только экспрессия одного изменялась достоверно и в противоположном направлении относительно гена-хозяина микроРНК: экспрессия гена *KIAA1217*, несущего пре-микроРНК hsa-mir-603, снижалась в 3 раза при воздействии производного оксихинолина, а экспрессия гена-мишени этой микроРНК, *CCND1*, повышалась в 4,4 раза.

Жизнеспособность и скорость деления клеток трофобласта коррелировала с уровнем экспрессии гена *CCND1*, кодирующего специфичный для G1-фазы деления циклин D1 [23]. Активация

неканонического Wnt-пути при воздействии лиганда Wnt5a усиливала пролиферацию и выживаемость клеток цитотрофобласта, что сопровождалось повышением экспрессии *CCND1* [24]. МикроРНК miR-603 за счет подавления экспрессии *CCND1* отрицательно регулировала клеточную пролиферацию и миграцию [25]. Таким образом, можно предположить, что снижение уровня экспрессии гена-хозяина miR-603 *KIAA1217* приводит к снижению уровня этой микроРНК и повышению экспрессии ее гена-мишени *CCND1* как компенсаторной реакции на активацию пути HIF-1 α . Это также косвенно подтверждается тем фактом, что экспрессия гена *MIR603* при воздействии производного оксигинолина снижается в 1,3 раза (FDR $p=0,009$).

Таким образом, показано, что влияние производного оксигинолина на клетки BeWo b30 в течение 24 ч, связанное с активацией HIF-1 α , не приводит к выраженной смерти клеток или дефектам межклеточных контактов, но снижает проницаемость клеток для глюкозы, возможно, за счет повышения поглощения глюкозы клетками. Кроме того, выявлено влияние производного оксигинолина на клетки трофобласта, что выражается в снижении экспрессии гена *KIAA1217* и входящего в его состав гена *MIR603*, кодирующего has-miR-603, и повышении экспрессии гена-мишени этой микроРНК – *CCND1*. Возможно, это компенсаторный механизм повышения выживаемости клеток при активации HIF-1 α .

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

- Zhang Y., Zhao H.-J., Xia X.-R., et al. Hypoxia-induced and HIF1 α -VEGF-mediated tight junction dysfunction in choriocarcinoma cells: Implications for preeclampsia. *Clin. Chim. Acta*, 2017, 5, 173–92.
- 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.
- Thompson C.B. Into thin air: How we sense and respond to hypoxia. *Cell*, 2016, 167, 9–11.
- Poloznikov A.A., Zakhariants A.A., Nikulin S. V., et al. Structure-activity relationship for branched oxyquinoline HIF activators: Effect of modifications to phenylacetamide ‘tail’. *Biochimie*, 2017, 133, 74–79.
- Osipyants A.I., Smirnova N.A., Khristichenko A.Y., et al. Enzyme-substrate reporters for evaluation of substrate specificity of HIF prolyl hydroxylase isoforms. *Biochemistry (Mosc.)*, 2017, 82, 1207–1214.
- Biró O., Fóthi Á., Alasztics B., Nagy B., et al. Circulating exosomal and argonaute-bound microRNAs in preeclampsia. *Gene*, 2019, 692, 138–144.
- Baranova A., Maltseva D., Tonevitsky A. Adipose may actively delay progression of NAFLD by releasing tumor-suppressing, anti-fibrotic miR-122 into circulation. *Obes. Rev.*, 2019, 20, 108–118.
- Nikulin S.V., Mnaflki N.A., Shilin S.A., et al. Ribosome inactivation and the integrity of the intestinal epithelial barrier. *Mol. Biol.(Mosk.)*, 2018, 52, 583–589.
- 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.
- Shkurnikov M.Y., Makarova Y.A., Knyazev E.N., et al. Profile of microRNA in blood plasma of healthy humans. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 160, 632–634.
- 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.
- 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.
- 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.
- Khaustova N.A., Maltseva D. V., Oliveira-Ferrer L., et al. Selectin-independent adhesion during ovarian cancer metastasis. *Biochimie*, 2017, 142, 197–206.
- 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.
- 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.
- 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.

18. 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.
19. Illsley N.P., Caniggia I., Zamudio S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, 54, 409–419.
20. Makarova J.A., Maltseva D.V, Galatenko V.V., et al. Exercise immunology meets MiRNAs. *Exerc. Immunol. Rev.*, 2014, 20, 135–164.
21. Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Turchinovich A.A., et al. Circulating microRNAs. *Biochemistry Mosc.*, 2015, 80, 1117–1126.
22. Chou C.-H., Shrestha S., Yang C.-D., et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*, 2018, 46, D296–D302.
23. Gates K.C., Goetzmann L.N., Cantlon J.D., et al. Effect of proline rich 15-deficiency on trophoblast viability and survival. *PLoS One*, 2017, 12, e0174976.
24. Meinhardt G., Saleh L., Otti G.R., et al. Wingless ligand 5a is a critical regulator of placental growth and survival. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 28127.
25. Mussnich P., D'Angelo D., Leone V., et al. The high mobility group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression. *Mol. Oncol.*, 2013, 7, 531–542.

HIF-1 α Activation Reduces Expression of the microRNA hsa-miR-603 Host Gene *KIAA1217* and Increases Expression of the Target *CCND1* Gene in BeWo b30 Cells

E. N. KNYAZEVA^{1,2,3,*}, E. A. KNYAZEVA¹, S. V. NIKULIN^{1,3}, A. Yu. KHRISTICHENKO¹, V. A. PETROV^{1,4}, A. TURCHINOVICH^{5,6}, and A. A. SERGIEVICH³

¹*Bioclinicum Scientific and Technical Center, Moscow, 115088 Russia*

²*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117198, Russia*

³*Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia*

⁴*Institute of Nanotechnologies of Microelectronics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 115487 Russia*

⁵*SciBerg e.Kfm, Mannheim, 68309 Germany*

⁶*Molecular Epidemiology C080, German Cancer Research Center, Heidelberg, 69120 Germany*

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

Received September 19, 2019

Revised October 5, 2019

Accepted October 13, 2019

Abstract—The model of the placental barrier based on the human choriocarcinoma cell line BeWo b30 allows studying the effect of hypoxia on trophoblast cells. The effect of the oxyquinoline derivative inhibiting HIF-prolyl hydroxylases was studied on this model. Inhibition of these enzymes leads to an increase in the HIF-1 α subunit in the cytoplasm, mimicking the cell response to hypoxia. Incubation of the cells with the drug at a concentration of 10 μ M for 24 h did not affect the paracellular transport, but reduced the transport of glucose through the cell barrier. The transcriptome analysis after the exposure with oxyquinoline derivative revealed a decreased expression of the *KIAA1217* gene and its intronic gene *MIR603*, which encodes microRNA hsa-miR-603. The expression of the target gene of this miRNA, *CCND1* encoding cyclin D1, after oxyquinoline derivative exposition increased significantly, which may indicate a potential microRNA–mRNA regulatory mechanism in the response of trophoblast cells to hypoxia.

Key words: BeWo b30, placenta, hypoxia, oxyquinoline, barrier, microRNA, cyclin

Acknowledgement—The study was performed with the equipment of the «Postgenomic and Metabolomic Methods of Study in Molecular Biology» Common Use Center (BioClinicum Scientific and Technical Center).

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 (Project no. RFMEFI58817X0007).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-80-86