

УДК 577.2:577.29:57.021

## Транскриптомный анализ сигнальных путей в клетках Сасо-2, участвующих в образовании ворсинок кишечника

© 2020 С. В. НИКУЛИН<sup>1,2,\*</sup>, М. П. РАЙГОРОДСКАЯ<sup>1</sup>, Д. А. САХАРОВ<sup>1</sup><sup>1</sup>Научно-технический центр «БиоКлиникум», Москва, 115088<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, 690091

\*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Поступила в редакцию 23.10.2019 г.

После доработки 10.11.2019 г.

Принята к публикации 15.01.2020 г.

Показано при помощи транскриптомного анализа, что сигнальные каскады BMP и PDGF, участвующие в образовании ворсинок кишечника *in vivo*, существенно затрагиваются в процессе дифференцировки клеток Сасо-2 и предположительно могут принимать участие в образовании похожих структур *in vitro*. В частности, обнаружено значительное снижение экспрессии генов *BMP4*, *BMP7* и *BMP8A* в дифференцированных клетках, по сравнению с недифференцированными. Кроме того, впервые обнаружены периодические колебания трансэпителиального сопротивления в процессе дифференцировки клеток Сасо-2. На основании периода наблюдаемых колебаний можно предполагать, что они возникают в результате пролиферации клеток при образовании ворсинок.

**Ключевые слова:** импедансная спектроскопия, кишечник, ворсинки, TEER, BMP, PDGF

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-25-29

Клетки линии Сасо-2 традиционно используются для создания *in vitro* моделей кишечного барьера, которые широко применяются для изучения абсорбции лекарственных средств на доклинических этапах исследований [1]. Образующие барьер эпителиальные клетки, прежде всего, характеризуются способностью формировать плотные межклеточные контакты, разделяющие апикальный и базолатеральный компартменты. Контроль целостности плотных контактов является ключевой задачей при работе с *in vitro*-моделями барьерных тканей. На сегодняшний день существуют несколько методов, позволяющих контролировать состояние плотных контактов, наиболее популярные из которых – использование меченых субстратов [2, 3] и измерение трансэпителиального сопротивления TEER [4]. Ранее нами было показано, что применение импеданс-спектроскопии для измерения TEER позволяет надежнее выявлять дефекты в полученных моделях, по сравнению с классическим способом, при этом сам метод является значительно менее трудоемким и времязатратным, по сравнению с использованием меченых субстратов [5].

Также при создании *in vitro*-моделей барьерных тканей важно стремиться к наиболее полному воспроизведению структуры кишечника. Полностью развитый кишечник характеризуется, в частности, наличием ворсинок [6]. Молекулярный механизм формирования ворсинок в кишечнике на сегодняшний день изучен не достаточно, однако, показано, что сигнальные пути BMP (Bone Morphogenetic Protein) и PDGF (Platelet Derived Growth Factor) играют важную роль в этом процессе [9, 10]. Недавно было показано, что клетки Сасо-2 при длительном культивировании в устройствах «орган-на-чипе» образуют выросты, похожие на ворсинки кишечника [7]. При математическом моделировании электрического поля в ячейке для культивирования наблюдалось постепенное снижение значений TEER в процессе роста ворсинок. Как было показано авторами при ранее проведенных единичных измерениях, значения TEER на поздних этапах культивирования клеток Сасо-2 в статических условиях также снижаются [8].

Цель данной работы – изучение процесса формирования ворсинок кишечника *in vitro* при

Список сокращений: TEER – трансэпителиальное/трансэндотелиальное сопротивление; *R* – коэффициент корреляции Пирсона; BMP – костный морфогенетический белок.

помощи транскриптомного анализа, а также детального анализа динамики изменений значений TEER на поздних этапах культивирования клеток Caco-2.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Реактивы и материалы

В работе были использованы следующие материалы: культуральные флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (TPP, Швейцария); питательная среда MEM (Gibco, США), фетальная бычья сыворотка (Gibco); раствор пенициллина 10000 МЕ/мл и стрептомицина 10 мг/мл (Gibco); раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса («ПанЭко», Россия); раствор DPBS («ПанЭко»); 96-луночные планшеты с мембранными вставками (средний размер поры – 1 мкм) Transwell (Corning, США).

### Культивирование эпителиальных клеток кишечника Caco-2

Клетки Caco-2 культивировали в питательной среде MEM (20% (об.) фетальной бычьей сыворотки и 1% (об.) раствора пенициллина и стрептомицина). Культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Субкультивирование производили каждые два-три дня.

Мембранные вставки перед посевом клеток заполняли питательной средой (50 мкл в верхнюю камеру, 235 мкл в нижнюю) и инкубировали в клеточном инкубаторе 1 ч. Затем в каждую мембранную вставку добавляли по 5600 кл. в 50 мкл питательной среды. Планшеты с мембранными вставками в течение всего эксперимента инкубировали в клеточном инкубаторе. Смену среды производили каждые два-три дня.

### Мониторинг значений TEER в режиме реального времени

Для определения значений TEER измеряли с периодичностью 1 ч импеданс-спектры в диапазоне частот от 20 Гц до 20 кГц (200 точек), при помощи системы импедансной спектроскопии (НТЦ «БиоКлиникум») и оригинальных позолоченных электродов (НТЦ «БиоКлиникум»). Эксперимент проводили в трех повторах. Значения TEER рассчитывали по описанной ранее эквивалентной электрической схеме [11], при помощи программного обеспечения CEISA Impedance fitting (НТЦ «БиоКлиникум»). Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи языка программирования R 3.5 с интегрированной средой разработки RStudio 1.1.

## Транскриптомный анализ

Проведен анализ экспрессии генов, участвующих в формировании ворсинок *in vivo*, при помощи микрочипов. Анализ уровней экспрессии генов, участвующих в сигнальных путях BMP и PDGF, в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 проводили при помощи микрочипов GeneChip Human Genome 1.0 ST (Affymetrix) по описанной ранее методике [8, 12–14]. Для лизиса клеток использовали лизирующий раствор QIAzol (Qiagen). Тотальную РНК выделяли, используя набор реагентов miRNeasy Mini Kit (Qiagen). Концентрацию выделенной РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Качество выделенной РНК оценивали с помощью системы Experion (Bio-Rad). Для гибридизации на микрочипах использовали по 500 нг РНК. Эксперимент проводили в трех повторах.

Обработку полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения TAC 4.0 (Thermo Fisher Scientific). Для оценки статистической достоверности различий уровней экспрессии генов использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Бенджамини-Хохберга и пороговым уровнем значимости 0,05. Гены, с уровнем экспрессии ниже 6,0 по логарифмической шкале Affymetrix, считались неэкспрессирующимися.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характерная зависимость TEER от времени с момента начала эксперимента при мониторинге роста клеток Caco-2 приведена на рис. 1.

Из полученных данных видно, что в моменты смены культуральной среды значения TEER кратковременно увеличиваются более чем на 500 Ом, что может быть объяснено охлаждением системы до комнатной температуры в связи со сменой среды, которое оказывает существенное влияние на результаты измерений. Интегральная зависимость значений TEER от времени на позднем этапе культивирования клеток Caco-2 (16–21-е сутки) не была выявлена (коэффициент корреляции Пирсона  $R = 0,02$ ;  $p = 0,81$ ). Эти данные достаточно хорошо согласуются с полученными ранее результатами измерений [7, 8, 15]. Отсутствие интегрального спада значений TEER может объясняться достаточно слабой зависимостью TEER от площади поверхности клеток на поздних этапах дифференцировки. Интересно, что мониторинг в режиме реального времени позволил обнаружить периодические слабые колебания (амплитуда около 100 Ом) значений трансэпителиального

сопротивления с характерным периодом 50–70 ч (рис. 1), который свидетельствует о том, что наблюдаемые изменения вызваны не циркадными ритмами, период которых может лишь незначительно отличаться от 24 ч [16–18]. Вероятнее всего, наблюдаемые колебания обусловлены делением клеток при формировании ворсинок. Согласно базе данных Cellosaurus [19] период удвоения клеток Caco-2 лежит в диапазоне от 32 до 80 ч, что вполне согласуется с полученными данными.

Известно, что мезенхимальные клетки в ходе образования ворсинок в кишечнике экспрессируют рецептор к тромбоцитарному фактору роста PDGFA, который секретируется эпителиальными клетками. Потеря рецептора к PDGFA либо самого PDGFA приводит к снижению скорости пролиферации мезенхимальных клеток и нарушению образования ворсинок [9, 10]. Однако при этом первое поколение ворсинок образуется нормально, и нарушения наблюдаются только в ходе дальнейшего развития кишечника. В данной работе было обнаружено, что клетки Caco-2 экспрессируют тромбоцитарный ростовой фактор PDGFA на достаточно высоком уровне и его экспрессия не меняется в процессе дифференцировки ( $p=0,548$ ). Однако экспрессия рецептора к PDGFA, кодируемого геном *PDGFRA*, снизилась в дифференцированных клетках Caco-2 в 2,36 раза ( $p=5 \cdot 10^{-6}$ ), что может свидетельствовать об участии сигнального пути PDGF в образовании структур, подобных ворсинкам кишечника.

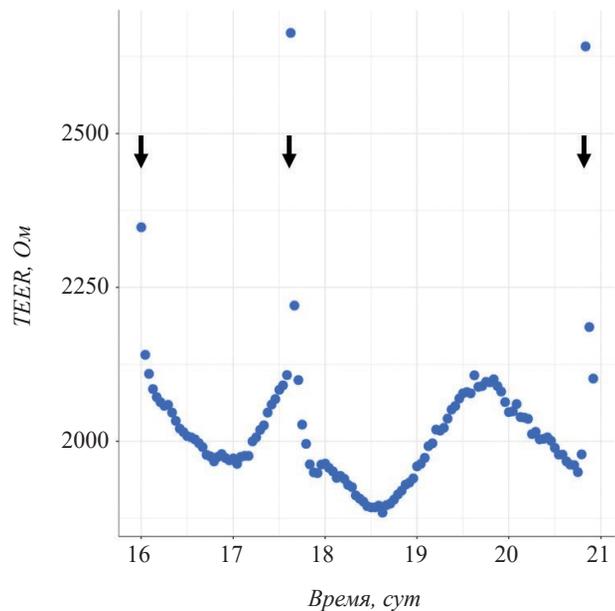


Рис. 1. Зависимость TEER от времени с момента начала эксперимента. Стрелками отмечены моменты смены культуральной среды

Fig. 1. A typical graph of TEER versus time of the Caco-2 cells growth. Arrows indicate the moments of change of culture medium

Также проведен анализ уровня экспрессии лигандов BMP в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 (табл. 1). Считается, что лиганды BMP во время развития кишечника экспрессируются мезенхимальными клетками

Таблица 1

Уровни экспрессии лигандов BMP в дифференцированных и недифференцированных клетках Caco-2 (по логарифмической шкале Affymetrix)

Expression of BMP ligands in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells (Affymetrix logarithmic scale)

Ген	Средний уровень экспрессии в клетках Caco-2		Fc	FDR p
	дифференцированные	недифференцированные		
<i>BMP1</i>	7,14	7,03	1,08	$1,19 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP2</i>	8,28	8,88	-1,51	$8,20 \cdot 10^{-3}$
<i>BMP3</i>	5,92	5,97	-1,03	$2,26 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP4</i>	7,99	9,38	-2,62	$1,70 \cdot 10^{-5}$
<i>BMP5</i>	4,44	4,45	-1,01	$9,53 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP6</i>	5,94	5,94	1,00	$9,79 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP7</i>	8,19	9,19	-1,99	$2,67 \cdot 10^{-5}$
<i>BMP8A</i>	7,20	8,02	-1,77	$9,68 \cdot 10^{-5}$
<i>BMP8B</i>	7,49	7,43	1,05	$5,01 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP10</i>	4,83	4,83	-1,01	$5,68 \cdot 10^{-1}$
<i>BMP15</i>	5,07	5,07	1,00	$7,82 \cdot 10^{-1}$

Примечание: Fc – относительное изменение уровня экспрессии гена в дифференцированных клетках по сравнению с недифференцированными; FDR p – p-уровень значимости с поправкой на множественные сравнения по методу Бенджамини–Хохберга

Note: Fc (Fold change) – the degree of change in the content of the mRNA in differentiated cells compared with undifferentiated; FDR p is the significance level adjusted for multiple comparisons according to the Benjamini-Hochberg method.

и, в свою очередь, оказывают на них преимущественное влияние [9, 10]. Их точная роль в формировании ворсинок на сегодняшний день неизвестна, однако, имеются данные, свидетельствующие о том, что добавление экзогенных лигандов ВМР препятствует образованию ворсинок [9]. Из полученных результатов видно, что экспрессия целого ряда лигандов ВМР (включая *ВМР4*, *ВМР7* и *ВМР8А*) в эпителиальных клетках Сасо-2 снизилась в процессе дифференцировки. Интересно, что также снизилась экспрессия рецепторов ВМР (*ВМР1А* в 1,19 раза,  $p=0,021$ ; *ВМР2* в 1,46 раза,  $p=0,001$ ). Следовательно, судя по имеющимся данным, активация сигнального пути ВМР *in vitro* также может препятствовать образованию структур, подобных ворсинкам кишечника *in vivo*.

Таким образом в данной работе при помощи мониторинга значений ТЕЕР в режиме реального времени было подтверждено, что в среднем значения ТЕЕР на поздних этапах культивирования клеток Сасо-2 практически не изменяются. Также впервые были обнаружены периодические слабые колебания трансэпителиального сопротивления, связанные, судя по всему, с клеточным циклом. В перспективе данные колебания могут быть использованы для мониторинга состояния различных *in vitro*-моделей барьерных тканей, в том числе состоящих и из первичных клеток. При этом из анализа транскриптомов следует, что сигнальные каскады, участвующие в образовании ворсинок и работающие *in vivo* в основном в соседних клетках стромы, существенно затронуты и в эпителиальных клетках в процессе образования ворсинкоподобных структур *in vitro*.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-19-10597).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.*, 2006, 22, 186–198.
- Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 1989, 96, 736–49.
- Hubatsch I., Ragnarsson E.G.E., Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.*, 2007, 2, 2111–2119.
- Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., et al. TEER measurement techniques for *in vitro* barrier model systems. *J. Lab. Autom.*, 2015, 20, 107–126.
- Nikulin S.V., Gerasimenko T.N., Shilin S.A., et al. Application of impedance spectroscopy for the control of the integrity of *in vitro* models of barrier tissues. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2019, 166, 512–516.
- Shyer A.E., Tallinen T., Nerurkar N.L., et al. Villification: How the gut gets its villi. *Science*, 2013, 342, 212–218.
- van der Helm M.W., Henry O.Y.F., Bein A., et al. Non-invasive sensing of transepithelial barrier function and tissue differentiation in organs-on-chips using impedance spectroscopy. *Lab. Chip.*, 2019, 19, 452–463.
- 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.
- Walton K.D., Freddo A.M., Wang S., Gumucio D.L. Generation of intestinal surface: an absorbing tale. *Development*, 2016, 143, 2261–2272.
- Chin A.M., Hill D.R., Aurora M., Spence J.R. Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 2017, 66, 81–93.
- Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Impedance spectroscopy and transcriptome analysis of choriocarcinoma BeWo b30 as a model of human placenta. *Mol. Biol.*, 2019, 53, 411–418.
- Nikulin S.V., Knyazev E.N., Gerasimenko T.N., et al. Non-invasive evaluation of extracellular matrix formation in the intestinal epithelium. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2018, 166, 35–38.
- 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.
- Semenova O.V., Petrov V.A., Gerasimenko T.N., et al. Effect of circulation parameters on functional status of heparg spheroids cultured in microbio-reactor. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, 161, 425–429.
- Henry O.Y.F., Villenave R., Crounce M.J., et al. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab. Chip.*, 2017, 17, 2264–2271.
- Izumo M., Johnson C.H., Yamazaki S. Circadian gene expression in mammalian fibroblasts revealed by real-time luminescence reporting: Temperature compensation and damping. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2003, 100, 16089–16094.
- Izumo M., Sato T.R., Straume M., Johnson C.H. Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput. Biol.*, 2006, 2, e136.
- Brown S.A., Fleury-Olela F., Nagoshi E., et al. The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol.*, 2005, 3, e338.
- Bairoch A. The Cellosaurus, a cell-line knowledge resource. *J. Biomol. Tech.*, 2018, 29, 25–38.

## Transcriptome analysis of signaling pathways involved in the formation of intestinal villi in Caco-2 cells

S. V. NIKULIN<sup>1, 2, \*</sup>, M. P. RAIGORODSKAYA<sup>1</sup>, D. A. SAKHAROV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scientific Research Center Bioclinicum, Moscow, 115088 Russia

<sup>2</sup>Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091 Russia

\*e-mail: s.nikulin@bioclinicum.com

Received October 23, 2019

Revised November 10, 2019

Accepted January 15, 2020

**Abstract**—Caco-2 cells are traditionally used to construct *in vitro* models of the intestinal barrier. One of the characteristics of the mature intestine is the presence of villi, outgrowths of connective tissue covered with epithelial cells. Recently it has been shown that during prolonged cultivation Caco-2 cells form structures resembling intestinal villi. Here, using transcriptome analysis, we showed that BMP and PDGF signaling involved in the formation of villi *in vivo* significantly altered during the differentiation of Caco-2 cells and, thus, can participate in the formation of similar structures *in vitro*. In particular, a significant decrease in the expression of the *BMP4*, *BMP7*, and *BMP8A* genes in differentiated cells compared to undifferentiated ones was found. Periodic fluctuations in transepithelial resistance during the differentiation of Caco-2 cells have been discovered for the first time. The period of observed fluctuations indicates that they can arise in the result of cell proliferation during the formation of villi. According to the period of observed fluctuations, one can suppose that they arise in the result of cell proliferation during the formation of villi.

*Key words*: impedance spectroscopy, intestine, villi, TEER, BMP, PDGF

**Funding**—The study was funded by the Russian Science Foundation (project 16-19-10597).

**doi**: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-25-29