

ВЛИЯНИЕ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ P53 НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА P53 В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЕРАТИНОЦИТОВ ЛИНИИ НАСАТ

А. Л. Русанов¹✉, П. М. Кожин^{1,2}, Д. Д. Ромашин¹, М. Н. Карагяур¹, Н. Г. Лузгина¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ИБМХ), Москва, Россия

² ООО НПО «Перспектива», Новосибирск, Россия

Клетки линии HaCaT являются распространенной моделью для исследования нормальных кератиноцитов человека. Однако для клеток этой линии характерны мутации в гене *TP53*, что существенно сказывается на функциях кодируемого белка. Особенности данного регуляторного контура необходимо учитывать при использовании клеток HaCaT в качестве объекта исследований физиологии и патологии кожи человека *in vitro*. Целью исследования было изучить особенности реализации программы дифференцировки в клетках линии HaCaT в условиях модуляции активности белка p53. Снижения уровня экспрессии p53 добивались нокдауном гена *TP53* с помощью shRNA (в 2,2 раза, $p < 0,05$), и, напротив, увеличения концентрации активных форм данного белка в клетках достигали за счет воздействия на клетки Nutlin-3a — ингибитора MDM2, основного негативного регулятора p53. Установлено, что регуляция как минимум трех маркеров дифференцировки, *CASP14*, *IVL* (увеличение экспрессии в 3,9 и 3,7 раза соответственно при нокдауне p53, $p < 0,05$) и *TGM1* (уменьшение экспрессии вдвое при нокдауне *TP53* и увеличение в 1,7 раза при воздействии на клетки Nutlin-3a, $p < 0,05$), в клетках HaCaT зависит от активности p53. При этом в отношении экспрессии *TGM1* и p53 отмечена прямая зависимость, которая, возможно, реализуется опосредованно, через изменение экспрессии $\Delta Np63$. В то же время модуляция активности p53 не приводит к значительным изменениям экспрессии цитокератинов.

Ключевые слова: HaCaT, дифференцировка кератиноцитов, p53, p63, $\Delta Np63$, TAp63, Nutlin-3a, shRNA, нокдаун

Финансирование: работа, включающая нокдаун гена p53, ИФА и ПЦР-исследования, выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы; эксперименты с применением Nutlin-3a были проведены на базе ООО НПО «Перспектива» при поддержке РФФИ, научно-исследовательский проект 18-44-540031/19.

Вклад авторов: Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — концепция исследования; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — дизайн исследования и анализ литературы; Д. Д. Ромашин, П. М. Кожин, М. Н. Карагяур — планирование и проведение исследования; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — анализ и интерпретация данных; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин — подготовка текста статьи; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, М. Н. Карагяур, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — редактирование рукописи, подготовка финального варианта статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование проведено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

✉ **Для корреспонденции:** Александр Леонидович Русанов
ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121; alexander.l.rusanov@gmail.com

Статья получена: 27.11.2020 **Статья принята к печати:** 14.12.2020 **Опубликована онлайн:** 25.12.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.082

IMPACT OF P53 MODULATION ON INTERACTIONS BETWEEN P53 FAMILY MEMBERS DURING HACAT KERATINOCYTES DIFFERENTIATION

Rusanov AL¹ ✉, Kozhin PM^{1,2}, Romashin DD¹, Karagyaur MN¹, Luzgina NG¹

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC), Moscow, Russia

² RMA "Perspektiva", Novosibirsk, Russia

HaCaT cell line is a widely used model for studying normal human keratinocytes. However, mutations of TP53 gene are typical for this cell line, which have a substantial impact on functions of the encoded protein. The features of this regulatory circuit should be considered when using HaCaT cells for assessment of human skin physiology and pathology *in vitro*. The study was aimed to assess the features of differentiation realization in HaCaT cells with modulated activity of p53 protein. The expression of p53 was reduced by knockdown of *TP53* gene by shRNA (by 2.2 times, $p < 0.05$), and the elevated concentration of the p53 active forms was achieved via exposure of cells to Nutlin-3a, the MDM2 inhibitor and the major negative regulator of p53. It has been found that regulation of at least three differentiation markers, *CASP14*, *IVL* (expression increase by 3.9 and 3.7 times respectively in the p53-knockdown cells, $p < 0.05$) and *TGM1* (twofold expression decrease in the p53-knockdown cells, and 1.7-fold expression increase under exposure to Nutlin-3a, $p < 0.05$) in HaCaT cells is p53-mediated. The positive correlation has been revealed for expression of *TGM1* and p53 that might be realized indirectly via $\Delta Np63$ expression alteration. At the same time, modulation of p53 does not result in significant alterations in expression of cytokeratins.

Keywords: HaCaT, keratinocytes differentiation, p53, p63, $\Delta Np63$, TAp63, Nutlin-3a, shRNA, knockdown

Funding: the study involving p53 gene knockdown, ELISA and PCR tests was performed as part of the Fundamental Scientific Research Programs of the State Academies of Sciences for 2013–2020; experiments with Nutlin-3a were carried out by RMA "Perspektiva" and supported by RFBR, project № 18-44-540031/19.

Author contribution: Luzgina NG, Rusanov AL — study concept; Romashin DD, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL — study design and literature analysis; Romashin DD, Kozhin PM, Karagyaur MN — study planning and execution; Kozhin PM, Romashin DD, Luzgina NG, Rusanov AL — data analysis and interpretation; Kozhin PM, Romashin DD — manuscript writing; Kozhin PM, Romashin DD, Karagyaur MN, Luzgina NG, Rusanov AL — manuscript editing, preparation of the final version of the article.

Compliance with ethical standards: the study was carried out in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander L. Rusanov
Pogodinskaya, 10, str. 8, Moscow, 119121; alexander.l.rusanov@gmail.com

Received: 27.11.2020 **Accepted:** 14.12.2020 **Published online:** 25.12.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.082

Процесс терминальной дифференцировки кератиноцитов является одним из возможных путей программируемой клеточной гибели. Он обеспечивает нормальную стратификацию клеток эпидермиса, необходимую для формирования полноценного эпидермального барьера. Нарушения процесса терминальной дифференцировки по той или иной причине лежат в основе формирования клинических проявлений многих хронических заболеваний кожи. Роль белков семейства p53 в регуляции процесса дифференцировки кератиноцитов активно исследуют в последние годы [1–4].

Известно, что белок p53 накапливается и опосредует апоптоз в эпидермисе в ответ на солнечный ожог [5] и ряд других цитотоксических воздействий. Наряду с этим, активные формы белка в большей степени обнаруживаются в пролиферирующих кератиноцитах, но не дифференцированных клетках [6]. Есть мнение, что p53 может играть двойную роль в выживании эпидермиса, поддерживая «здоровые» пролиферативные клетки и вызывая гибель сильно поврежденных [7].

Группа исследователей установила, что p53 стимулирует пролиферацию и замедляет дифференцировку в нормальных кератиноцитах человека путем инактивации сигналинга, опосредованного протоонкогеном MYC [7]. При этом в клетках с нокадаун p53 наблюдали существенное увеличение экспрессии инволюкрина, кератинов KRT1 и KRT10, филагтрина — маркеров клеточной дифференцировки. В целом, для клеток с инактивированным p53 была характерна более высокая скорость стратификации и открепления [7].

Однако специфическая роль белков семейства p53 и их взаимодействие на разных этапах дифференцировки кератиноцитов человека в норме и при патологиях охарактеризованы недостаточно подробно.

В еще меньшей степени исследована роль белков данного семейства в регуляции пролиферации и дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT — спонтанно иммортализованных неканцерогенных кератиноцитов человека [8]. Данная клеточная линия получила широкое распространение в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека [9, 10]. Однако в кератиноцитах линии HaCaT нарушены программа стратификации и экспрессия маркеров дифференцировки [11].

Известно, что в геноме кератиноцитов HaCaT присутствуют две аллели гена *TP53* (H179Y и R282Q), которые содержат две gain-of-function (GOV) мутации, приобретенные в результате спонтанной иммортализации (*mutp53*) [12]. *Mutp53* в клетках линии HaCaT обладает выраженной активностью в отношении увеличения скорости пролиферации и роста клеток и имеет более 7000 сайтов связывания с ДНК. При этом связанные с запуском апоптоза функции белка сохранены [4].

Кроме того, в отличие от нормальных кератиноцитов, клетки линии HaCaT преимущественно экспрессируют ΔNα изоформу p63, а изоформа TA практически не детектируется [13].

Понимание особенностей физиологии клеток HaCaT и лежащих в их основе молекулярных механизмов необходимо для оценки ограничений при использовании таких клеток в качестве модельных. Кроме того, изучение особенностей взаимодействия белков семейства p53 в условиях присутствия в геноме клеток *mutp53* позволит получить новые данные, актуальные для исследования канцерогенеза [14, 15].

Целью настоящего исследования было изучить регуляторную роль белков семейства p53 в процессах

пролиферации и дифференцировки клеток линии HaCaT. В ходе исследования осуществляли модуляцию белка p53: активацию обеспечивали путем воздействия Nutlin-3a (блокатор MDM2, основного негативного регулятора p53), а для подавления экспрессии p53 применяли anti-TP53 shRNA.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии и условия культивирования

Клеточная линия HaCaT была приобретена в коллекции клеточных культур German Cancer Research Center (DKFZ, Heidelberg; Германия). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в среде DMEM/F12 (1:1, Gibco; США) с добавлением 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific; США), раствора пенициллина/стрептомицина в концентрации 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Диа-М»; Россия) — полная культуральная среда. Клетки выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см² или в чашках Петри диаметром 60 мм (Corning; США). Среду заменяли на свежую через каждые 48 ч культивирования.

Нокадаун гена *TP53* с помощью shRNA

Для нокадаун гена *TP53* использовали лентивирусный вектор, который кодирует anti-TP53 shRNA. Для сборки лентивирусного вектора клетки линии HEK2937T трансфицировали вектором pLKO-p53-shRNA (Addgene, #25637), используя стандартный протокол для трансфекции с помощью полиэтиленимина (PEI) [16]. Кондиционная среда, содержащая лентивирусные частицы, была собрана спустя 48–72 ч культивирования после трансфекции. Для увеличения эффективности трансдукции в среду с лентивирусными частицами добавляли сульфат протамина (50 мкг/мл). Для трансдукции кератиноциты линии HaCaT выращивали до конфлюентности 40–50%, после чего среду культивирования заменяли на среду с лентивирусными частицами. Далее клетки центрифугировали при 800g в течение 1,5 ч. По завершении центрифугирования кондиционную среду заменяли на полную культуральную среду. В качестве контрольной линии для селекции с пуromицином использовали клетки дикого типа (WT HaCaT), трансдуцированные вектором *lego-ig2* (Addgene #27341), не содержащим ген устойчивости к пуromицину. После трансдукции клетки обеих линий (контрольной и экспериментальной) культивировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 4 суток, после чего заменяли среду на содержащую пуromицин (1 мкг/мл) и культивировали до гибели 100% клеток контрольной линии. За это время также погибали нетрансдуцировавшиеся клетки в экспериментальной группе.

Определение уровня экспрессии генов

Клетки выращивали в 60 мм чашках Петри в полной культуральной среде при 37 °C и 5% CO₂. По достижении 60% конфлюентности среду культивирования заменяли на содержащую Nutlin-3a (Merck; Германия). Клетки инкубировали в течение 24 ч и использовали для дальнейших экспериментов.

РНК выделяли с помощью набора RNeasy Kit (QIAGEN; США) согласно протоколу производителя. Количество полученной РНК измеряли на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Для проведения реакции обратной транскрипции использовали коммерческий набор MMLV RT

Таблица 1. Используемые праймеры

Ген	Последовательность праймеров
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3' Probe R6G-5'-AGCCGAGCCACATCGCTCAGACACCAT-3'-Q Reverse 5'-ACCAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'
<i>TP53</i>	Forward 5'-CTCACCATCATCAGACTGGAA-3' Probe FAM-5'-TACTGGGACGGAACAGCTTTGAGG-3'-Q Reverse 5'-CCAGGACAGGCACAAACA-3'
<i>ΔNp63</i>	Forward 5'-AGAAGAAAGGACAGCAGCATTGAT-3' Probe FAM-5'-TCCTGAACAGCATGGACCAGCAGA-3'-Q Reverse 5'-GGACGAGGAGCCGTTCTGA-3'
<i>TAp63</i>	Forward 5'-CCAGAGCACACAGACAAATG-3' Probe FAM-5'-ACAGCCTATATGTTCACTTCAAGCCCA-3'-Q Reverse 5'-TGATGGTTCATCCACAAAGTTC-3'
<i>TP63</i>	Forward 5'-CGTACAGGCAACAGCAACAG-3' Probe FAM-5'-CAGCAGCACCAGCACTTACTTCAGA-3'-Q Reverse 5'-CACAGAAGGCAGCTTGTTCA-3'
<i>TGM1</i>	Forward 5'-TGCTGGATGCCTGCTTAT-3' Probe FAM-5'-TGGTGAACCTCCCTGGATGACAATGG-3'-Q Reverse 5'-ACCAGACCAGTCCCAATC-3'
<i>IVL</i>	Forward 5'-CCAAGCCTCTGCCTCAG-3' Probe FAM-5'-AGATGTCCAGCAACACACACTGC-3'-Q Reverse 5'-GTATTGACTGGAGGAGGAACAG-3'
<i>KRT14</i>	Forward 5'-CTGAAGAAGAACCACGAGGA-3' Probe FAM-5'-AGGTGGTGGAGATGTCATGTGG-3'-Q Reverse 5'-TCTCTGCCATCTTCTCATACTG-3'
<i>KRT10</i>	Forward 5'-AGCATGGCAACTCACATCA-3' Probe FAM-5'-ATTTGCTGTAGTCACGAGGCTCCC-3'-Q Reverse 5'-GTCGATCTGAAGCAGGATGT-3'
<i>CASP14</i>	Forward 5'-CCTGTGCGAGGAGAACAAGG-3' Probe FAM-5'-AAAGACAGCCACAAACCATCCCA-3'-Q Reverse 5'-TGCAAGGCATCTGTGTATGT-3'

(«Евроген»; Россия) по стандартному протоколу, добавляя в реакцию по 1 мкг РНК. ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили, используя реакцию смесь qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Для каждой группы использовали три биологических образца, для каждого гена и каждого образца реакцию проводили в трех повторях. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Используемые праймеры представлены в табл. 1.

Определение метаболической активности

Определение метаболической активности клеток было проведено с помощью МТТ-анализа [17]. Клетки рассаживали в 96-луночный планшет (Corning; США) из расчета $3,0 \times 10^3$ клеток на лунку за 48 ч до воздействия, 6 лунок для каждой концентрации Nutlin-3a. Спустя двое суток культивирования среду заменяли на свежую среду, содержащую Nutlin-3a в концентрациях 0,2–50 мкМ, и инкубировали клетки в течение 24 ч. По завершении культивирования среду заменяли на свежую среду, содержащую МТТ («Диа-М»; Россия) в концентрации 1 мг/мл. Клетки инкубировали 2 ч, образовавшиеся гранулы формазана растворяли в ДМСО (Helicon; Россия). Затем проводили измерение оптической плотности при длине волны 490 нм. Эксперимент проводили в трех независимых биологических повторях.

Иммуноферментный анализ

Для полуколичественного определения уровня p53 использовали коммерческий набор ab205713 (Abcam; Великобритания) в соответствии с руководством производителя. Клетки рассаживали в 96-луночный

планшет в трех повторях в плотности 1×10^4 клеток на лунку. Интенсивность сигнала измеряли с помощью спектрофотометра iMark (Bio-Rad; США) на длине волны 450 нм.

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки культивировали на покровных стеклах в 6-луночных планшетах. Клетки фиксировали в 4%-м формалине, пермеабелизовали 0,1% Тритоном X-100, окрашивали первичными антителами к $\Delta Np63$ (#619002, Biolegend; США), TAp63 (#618902, Biolegend; США), KRT5 (ab52635, Abcam; Великобритания), KRT10 (ab9025, Abcam; Великобритания) и вторичными Alexa Fluor 488-конъюгированными (ab150105, Abcam; Великобритания) или Texas Red-конъюгированными (ab6793, Abcam; Великобритания) антителами. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно, используя один и тот же набор реактивов (разведений антител и буферов). Эксперимент проводили в трех независимых биологических повторях.

Полученные препараты последовательно визуализировали с помощью лазерного конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss; Германия) с использованием одинаковых настроек. Для каждого препарата фотографировали не менее 5 полей зрения. Обработку фотографий проводили в программе CellProfiler 3.1.9 [18]. Анализировали не менее 100 клеток для каждого образца, вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции (интенсивность флуоресценции клетки, поделенная на площадь клетки). Значения средней интенсивности флуоресценции нормировали на значение средней интенсивности флуоресценции в контрольной группе.

Анализ данных

Для анализа использовали данные, полученные от трёх биологических повторов. Результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R [19]. Межгрупповые различия величин анализируемых параметров определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественное сравнение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение линии HaCaT с нокадаун *TP53* подтверждали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Трансдукция anti-*TP53* shRNA приводила к значительному (в 2,2 раза, $p < 0,05$), но не полному снижению внутриклеточной концентрации *p53* (ИФА) (рис. 1А).

Метаболическую активность клеток дикого типа и клеток с нокадаун *TP53* в условиях воздействия ингибитора активности MDM2, Nutlin-3a оценивали с помощью МТТ-теста (рис. 1Б). Воздействие Nutlin-3a в течение 24 ч приводило к дозозависимому снижению количества образовавшегося формазана в клетках линии HaCaT дикого типа. Значения IC10 и IC50 составили $0,18 \pm 0,10$ мкМ и $129,11 \pm 167,78$ мкМ соответственно.

Такое же экспериментальное воздействие на клетки с нокадаун *TP53* не влияло на продукцию формазана. Значимые различия в продукции формазана данными клетками в сравнении с клетками дикого типа наблюдали при воздействии Nutlin-3a в концентрации 10 мкМ и выше. В связи с этим для дальнейших экспериментов использовали Nutlin-3a в концентрации 10 мкМ.

Выявленные особенности влияния Nutlin-3a на метаболическую активность клеток с нокадаун *TP53* могут быть связаны со значительным снижением в таких клетках содержания активных форм *p53*. При этом блокирование MDM2-зависимой деградации *p53*, обусловленное Nutlin-3a, по-видимому, не приводит к повышению его концентрации, достаточному для

реализации основных эффектов *p53* (остановка клеточного цикла, апоптоз).

Экспрессия генов ряда белков, отражающая активность процессов дифференцировки кератиноцитов, в интактных клетках дикого типа и клеток с нокадаун *TP53* различалась (рис. 2А). Так, по сравнению с клетками дикого типа в клетках с нокадаун была отмечена более высокая экспрессия генов, кодирующих инволюкрин и каспазу 14, в то же время экспрессия гена *TGM1* была ниже. Значимых различий в уровне экспрессии цитокератинов (ПЦР, флуоресцентная микроскопия) зарегистрировано не было (рис. 2А, Б, В). Кроме того, в клетках с нокадаун была снижена экспрессия генов, кодирующих изоформы *p63*, $\Delta Np63$ и *TArp63*. Также наблюдалось снижение количества указанных белков в цитоплазме и ядре (микроскопия) (рис. 3А, Б).

Воздействие Nutlin-3a на клетки дикого типа приводило к увеличению активности гена *P21* в два раза, что свидетельствует о накоплении в клетках активных форм *p53*. При этом было зарегистрировано увеличение экспрессии гена *TGM1*, гена, кодирующего синтез изоформы *p63* ($\Delta Np63$), незначительное увеличение экспрессии *IVL*, уровень которого, однако, оставался существенно более низким, чем в клетках с нокадаун. В то же время достоверных изменений уровня *CASP14* и экспрессии цитокератинов 14 и 10 (ПЦР) выявлено не было. Данные по экспрессии цитокератина 10 подтверждены данными микроскопии. При этом было зарегистрировано увеличение в 1,54 раза содержания цитокератина 5 (микроскопия). Интересно, что наряду с увеличением экспрессии $\Delta Np63$, наблюдалось уменьшение количества этого белка как в ядре, так и в цитоплазме клеток. При этом количество *TArp63* в ядре и цитоплазме клеток увеличивалось.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Настоящее исследование направлено на изучение особенностей влияния белков семейства *p53* на процесс дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT. При этом было изучено изменение экспрессии маркеров дифференцировки в зависимости от активности *p53*:

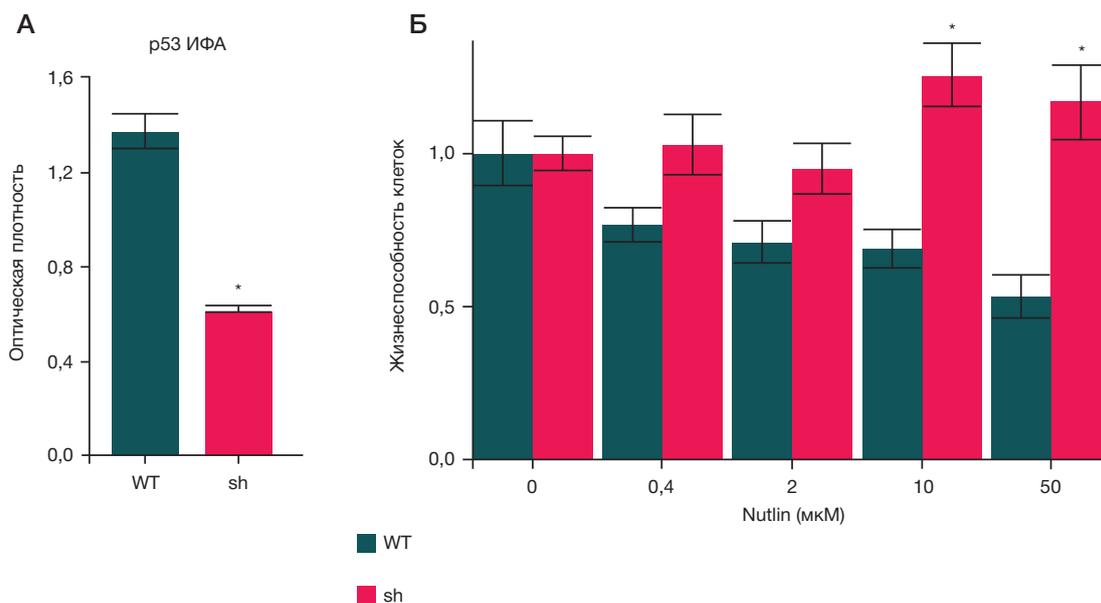


Рис. 1. Эффекты модуляции *TP53* посредством нокадауна и воздействия Nutlin-3a. **А.** Полуколичественное определение концентрации *p53* в клетках дикого типа (WT) и в клетках с нокадаун *TP53* (sh). **Б.** Метаболическая активность клеток (МТТ-тест) после воздействия Nutlin-3a. * — значимые различия между группами WT и sh ($p < 0,05$)

снижения экспрессии p53 достигали за счет нокдауна *TP53*, а увеличения активности белка — за счет добавления в культуральную среду Nutlin-3a.

В качестве маркеров дифференцировки кератиноцитов были выбраны белки, экспрессия которых увеличивается в нормальных кератиноцитах по мере продвижения клеток эпидермиса от базального слоя к роговому (IVL, TGM1 и CASP14). Так, инволюкрин (IVL) является представителем структурных белков кератиноцитов, обеспечивающих механическую прочность эпидермального барьера. Кроме того, комплексы инволюкринина с липидами (омега-гидроксицерамидами) участвуют в формировании водонепроницаемой нерастворимой оболочки клеток рогового слоя эпидермиса [20]. Инволюкрин является одним из основных субстратов трансглутаминазы 1-го типа (TGM1), которая катализирует образование поперечных связей между остатками лизина в структурных белках эпидермиса [21]. TGM1 имеет критическое значение при формировании эпидермального барьера [21]. Каспаза 14 (CASP14), в отличие от других белков данного семейства, специфически экспрессируется в эпидермисе, практически не участвует в реализации апоптоза, но при этом является регулятором дифференцировки кератиноцитов [22].

Для оценки степени дифференцированности клеток также исследовали экспрессию кератинов — KRT10, KRT5, KRT14 (компоненты белков промежуточных филаментов цитоскелета кератиноцитов). Известно, что высокое содержание KRT1 и KRT10 наиболее характерно

для дифференцирующихся кератиноцитов [23], в отличие от кератинов KRT5 и KRT14, активно экспрессирующихся в клетках базального слоя эпидермиса [24].

В тех же экспериментальных условиях оценивали экспрессию других членов семейства p53, $\Delta Np63$ и TAp63, что позволило оценить ее зависимость от активности p53.

Ранее было проведено исследование влияния снижения экспрессии p53 (в результате нокдауна *TP53*) на экспрессию маркеров дифференцировки нормальных кератиноцитов человека [7]. Таким образом, сопоставление экспериментальных данных с данными литературы, возможно, позволит получить информацию о сходстве и различии влияния белков семейства p53 на процесс дифференцировки в нормальных кератиноцитах и клетках линии HaCaT.

Следует отметить, что в ходе настоящего исследования не было достигнуто полное подавление экспрессии p53 в клетках HaCaT. Это может быть связано с устойчивостью клеток этой линии к действию реагентов для трансдукции/трансфекции (в сравнении с клетками эпителия внутренних органов) [25]. Однако снижение экспрессии p53 было значительным (в 2,2 раза).

Среди исследованных нами маркеров дифференцировки кератиноцитов, в большей степени ассоциированных с изменением экспрессии p53, оказались гены *IVL*, *CASP14* и *TGM1*. Наиболее зависимой от активности p53 оказалась экспрессия гена *TGM1*: величина этого показателя значительно снижалась в клетках с нокдауном *TP53* и возрастала при воздействии Nutlin-3a.

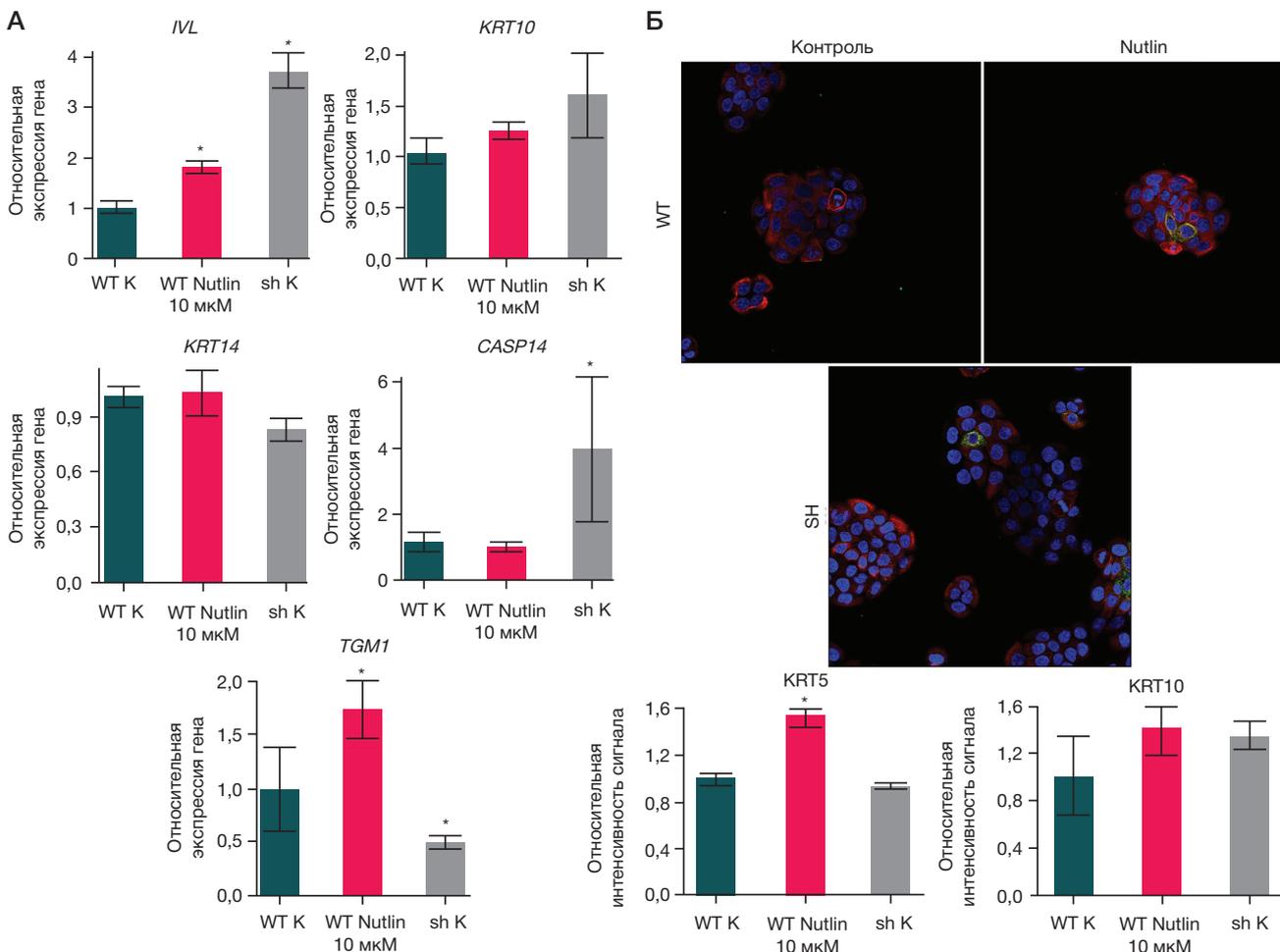


Рис. 2. Экспрессия маркеров дифференцировки в клетках HaCaT. **А.** Экспрессия *IVL*, *KRT10*, *KRT14*, *CASP14*, *TGM1*. **Б.** Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия: KRT5 (красный), KRT10 (зеленый), DAPI (синий, ядра), увеличение $\times 400$. **В.** Обобщенная диаграмма интенсивности относительной флуоресценции в клетках. * — значимые различия между экспериментальными группами (sh, Nutlin-3a) и интактными клетками (WT K), $p < 0,05$

Следует отметить, что уровень экспрессии *TGM1* и инволюкрин, белка, являющегося субстратом для *TGM1*, а также динамика изменения величин указанных параметров в исследованных экспериментальных ситуациях не совпадали. Экспрессия инволюкрин значительно возрастала в клетках с нокаутом *TP53*, но также возрастала, хоть и в меньшей степени, при воздействии Nutlin-3a. Вероятно, несмотря на очевидную функциональную взаимосвязь *TGM1* и инволюкрин, регуляция их экспрессии в клетках HaCaT различается.

В отличие от нормальных кератиноцитов, не реагирующих изменением экспрессии p63 в ответ на нокаут p53 [7], в нашем исследовании модуляция активности p53 в клетках HaCaT приводила к изменению экспрессии изоформ p63. Ранее о снижении экспрессии TP63 в клетках HaCaT с нокаутом p53 также сообщили [4].

Известно, что изоформы p63, в особенности ΔNp63, являются ингибиторами активности p53 [1]. Нельзя исключить, что высокая базовая экспрессия ΔNp63 в клетках HaCaT направлена на инактивацию эффектов mtrp53. В этой связи зарегистрированное нами изменение соотношения p53 и изоформ p63 (ΔNp63, TAp63) в клетках с нокаутом *TP53* по сравнению с интактными

клетками представляется закономерным — в отсутствие белка, функцию которого необходимо ингибировать (p53), наблюдается снижение экспрессии изоформ p63. Отмеченное нами противоречие в динамике экспрессии ΔNp63 при воздействии Nutlin-3a (рост экспрессии по данным исследования методом ПЦР наряду с уменьшением количества белка в цитоплазме и ядре клеток) может представлять собой результат участия белка ΔNp63 в инактивации p53, например, в результате образования гетеродимеров ΔNp63/p53 [26].

В то же время увеличение количества белка TAp63 в клетках без значимого изменения уровня экспрессии кодирующего данный белок гена в той же экспериментальной ситуации может быть связано с ингибированием активности MDM2. Согласно данным литературы [27], а также полученным нами данным, MDM2 может быть негативным регулятором активности не только p53, но и TAp63.

Известно, что по мере продвижения кератиноцитов от базального слоя к выше расположенным слоям активность p53 увеличивается, в том числе из-за постепенного снижения ингибирующего влияния ΔNp63. В результате p53 реализует свои функции, необходимые для завершения процесса кератинизации. В частности, он обеспечивает

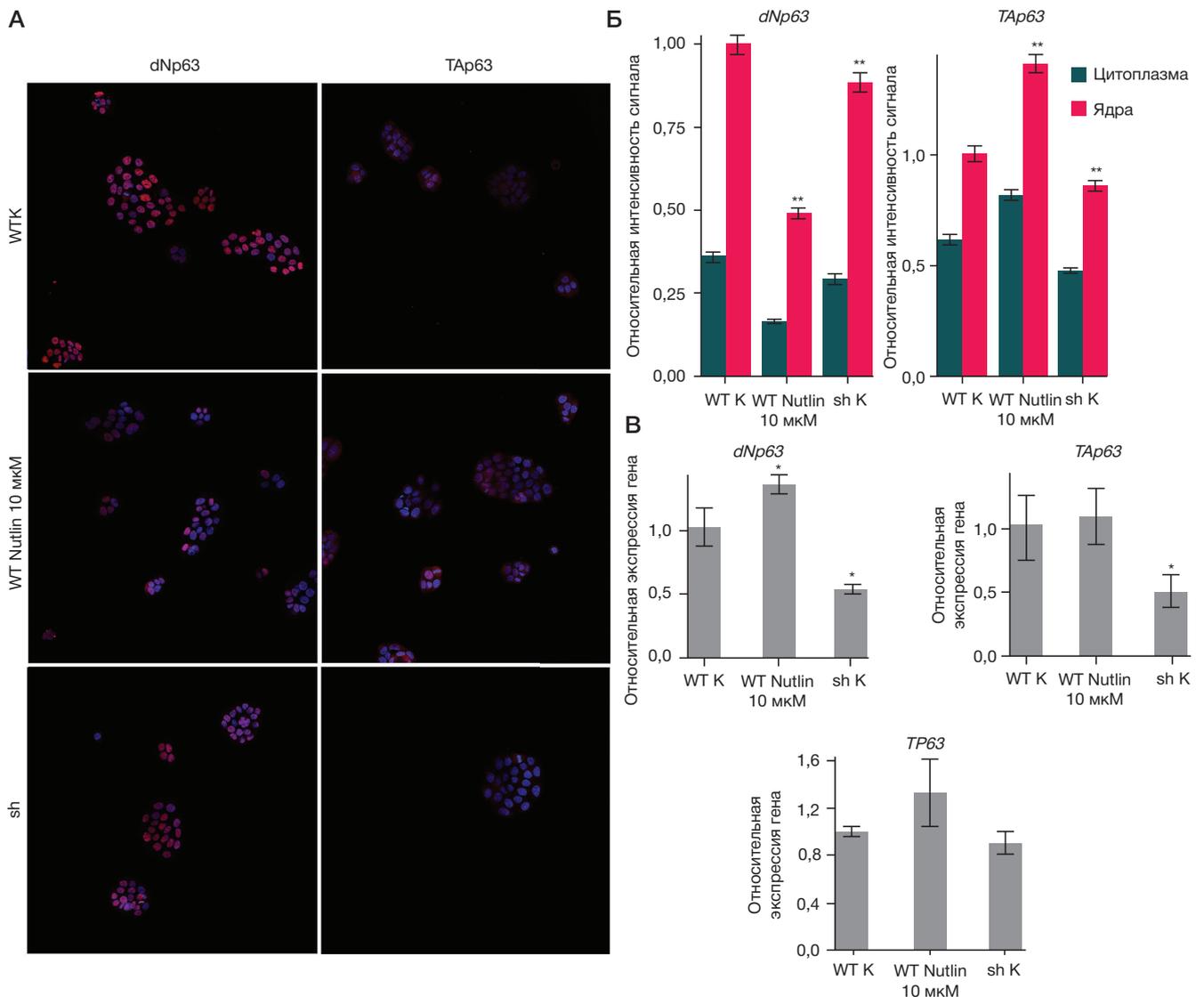


Рис. 3. Изменения экспрессии изоформ p63. **А.** Иммунофлуоресцентная конфокальная микроскопия: dNp63, TAp63 (красный), DAPI (синий), увеличение x400. **Б.** Обобщенная диаграмма интенсивности флуоресценции в цитоплазме и ядре клеток. **В.** Экспрессия изоформ TP63 (dNp63, TAp63). * — значимые различия между экспериментальными группами (sh, Nutlin-3a) и интактными клетками (WT K), $p < 0,05$

экспрессию TGM1, субстрат для которого (инволюкрин) нарабатывается в более низких слоях эпидермиса под влиянием иных регуляторных механизмов.

Нельзя исключить, что основным регулятором экспрессии TGM1 в клетках HaCaT является не p53 непосредственно, а белок ΔNp63. Как видно, динамика изменения экспрессии гена, кодирующего данный белок, является однонаправленной с изменениями экспрессии гена, кодирующего TGM1. Причем это изменение экспрессии ΔNp63 очевидно было связано с изменением активности p53 в клетках.

Очевидно влияние активности p53 в клетках HaCaT на экспрессию другого маркера дифференцировки кератиноцитов — каспазы 14. В клетках с нокадаун TP53 экспрессия кодирующего CASP14 гена значительно возрастала. По-видимому, в клетках HaCaT p53 прямо или косвенно эффективно ингибирует экспрессию этого белка. При этом активность такого воздействия достаточно высока — увеличение активности p53 в результате действия Nutlin-3a на клетки не приводило к значимому снижению экспрессии CASP14.

Следует отметить, что в условиях модуляции активности p53 в клетках HaCaT не возникали значимые изменения экспрессии цитокератинов. Исключение составил KRT5 — маркер клеток в составе низкорасположенных слоев эпидермиса. Его экспрессия незначительно возрастала при воздействии Nutlin-3a, по-видимому, в

результате активации эффектов mutp53, способствующих пролиферации клеток [4]. Экспрессия KRT10, характерная для дифференцирующихся кератиноцитов [23], в клетках с нокадаун p53 не менялась. При этом угнетение функции p53 в нормальных кератиноцитах сопровождается увеличением экспрессии указанных цитокератинов [7]. В клетках HaCaT mutp53 обладает выраженным ингибирующим действием на экспрессию этих белков, которое сохраняется в условиях неполного нокадауна TP53.

Выводы

В условиях модуляции активности p53 в клетках линии HaCaT меняется экспрессия отдельных маркеров дифференцировки клеток — в частности, каспазы 14, инволюкрин и трансглутаминазы-1, но не кератина KRT10. В отличие от нормальных кератиноцитов человека, клетки HaCaT реагируют на уменьшение активности p53 снижением экспрессии изоформ p63. Результаты настоящего исследования могут быть приняты во внимание при исследовании процессов, связанных с дифференцировкой кератиноцитов, и использовании линии HaCaT в качестве клеточной модели кожи. Полученные данные позволяют более детально оценить роль экспрессируемых линией HaCaT белков семейства p53 в различных физиологических процессах.

Литература

- Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The ΔNp63α phosphoprotein binds the P21 and 14-3-3σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (7): 2264–76.
- Botchkarev VA, Flores ER. P53/P63/P73 in the epidermis in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4 (8): a015248.
- Koster MI, Roop DR. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23 (1): 93–113.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, Dolfini D, Zambelli F, Imbriano C, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012 Feb; 3 (2): 132–43.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and P53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372 (6508): 773–6.
- Dazard JE, Piette J, Basset-Seguain N, Blanchard JM, Gandarillas A. Switch from P53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene.* 2000; 19 (33): 3693–705.
- Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R, et al. Inactivation of P53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep.* 2014; 9 (4): 1349–60.
- Seo E-Y, Piao Y-J, Kim J-S, Suhr K-B, Park J-K, Lee J-H. Identification of calcium-induced genes in HaCaT keratinocytes by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization. *Arch Dermatol Res.* 2002; 294 (9): 411–18.
- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, Larina OV, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4.
- Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the proteome of HaCaT keratinocytes induced by cytotoxic substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (5): 620–2.
- Smits J, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems I, van de Zande G, Zeeuwen P, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): pii: 11838.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 833–9.
- Jung Y-S, Qian Y, Yan W, Chen X, Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through P63. *J Invest Dermatol.* 2013; 133 (5): 1178–87.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223: 116–26.
- Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192: 209–18.
- Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013; 529: 227–40.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, et al. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, et al, Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
- McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kamensky L, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biol.* 2018; 16 (7): e2005970. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; R foundation for statistical computing: Vienna, Austria. 2013.
- Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. Involucrin — structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol.* 1993; 100 (5): 613–7.
- Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 1991; 5 (15): 3071–7.
- Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 2008; 180 (3): 451–8.

23. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1993; 120 (1): 217–25.
24. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 345–82.
25. Могулевцева Ю. А., Мезенцев А. В., Брускин С. А. Оценка терапевтического потенциала РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы для лечения псориаза. *Вестник РГМУ.* 2017; (3): 37–45.
26. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 285–95.
27. Galli F, Rossi M, D'Alessandra Y, De Simone M, Lopardo T, Haupt Y, et al. MDM2 and Fbw7 cooperate to induce p63 protein degradation following DNA damage and cell differentiation. *J Cell Sci.* 2010; 123 (14): 2423–33.

References

1. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA. The $\Delta Np63\alpha$ phosphoprotein binds the P21 and 14-3-3 σ promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay–Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (7): 2264–76.
2. Botchkarev VA, Flores ER. P53/P63/P73 in the epidermis in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4 (8): a015248.
3. Koster MI, Roop DR. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23 (1): 93–113.
4. Martynova E, Pozzi S, Basile V, Dolfini D, Zambelli F, Imbriano C, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012 Feb; 3 (2): 132–43.
5. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J, et al. Sunburn and P53 in the onset of skin cancer. *Nature.* 1994; 372 (6508): 773–6.
6. Dazard JE, Piette J, Basset-Seguin N, Blanchard JM, Gandarillas A. Switch from P53 to MDM2 as differentiating human keratinocytes lose their proliferative potential and increase in cellular size. *Oncogene.* 2000; 19 (33): 3693–705.
7. Freije A, Molinuevo R, Ceballos L, Cagigas M, Alonso-Lecue P, Rodriguez R, et al. Inactivation of P53 in human keratinocytes leads to squamous differentiation and shedding via replication stress and mitotic slippage. *Cell Rep.* 2014; 9 (4): 1349–60.
8. Seo E-Y, Piao Y-J, Kim J-S, Suhr K-B, Park J-K, Lee J-H. Identification of calcium-induced genes in HaCaT keratinocytes by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization. *Arch Dermatol Res.* 2002; 294 (9): 411–18.
9. Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, Larina OV, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4.
10. Rusanov AL, Nakhod KV, Nakhod VI, Poverennaya EV, Petushkova NA, Luzgina NG. Changes in the proteome of HaCaT keratinocytes induced by cytotoxic substance Triton X-100. *Bull Exp Biol Med.* 2017; 163 (5): 620–2.
11. Smits J, Niehues H, Rikken G, van Vlijmen-Willems I, van de Zande G, Zeeuwen P, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): pii: 11838.
12. Lehman TA, Modali R, Boukamp P, Stanek J, Bennett WP, Welsh JA, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14: 833–9.
13. Jung Y-S, Qian Y, Yan W, Chen X. Pirh2 E3 ubiquitin ligase modulates keratinocyte differentiation through P63. *J Invest Dermatol.* 2013; 133 (5): 1178–87.
14. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223: 116–26.
15. Muller PA, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192: 209–18.
16. Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013; 529: 227–40.
17. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, et al. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, et al, Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
18. McQuin C, Goodman A, Chernyshev V, Kametsky L, et al. CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLOS Biol.* 2018; 16 (7): e2005970. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005970>.
19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing; R foundation for statistical computing: Vienna, Austria. 2013.
20. Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF. Involucrin — structure and role in envelope assembly. *J Invest Dermatol.* 1993; 100 (5): 613–7.
21. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J.* 1991; 5 (15): 3071–7.
22. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 2008; 180 (3): 451–8.
23. Dlugosz AA, Yuspa SH. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 1993; 120 (1): 217–25.
24. Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 1994; 63: 345–82.
25. Mogulevtseva YuA, Mezentsev AV, Bruskin SA. RNA interference targeting interstitial collagenase is a potential therapeutic tool to treat psoriasis. *Bulletin of RSMU.* 2017; (3): 35–42.
26. Xu J, Reumers J, Couceiro JR, De Smet F, Gallardo R, Rudyak S, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7: 285–95.
27. Galli F, Rossi M, D'Alessandra Y, De Simone M, Lopardo T, Haupt Y, et al. MDM2 and Fbw7 cooperate to induce p63 protein degradation following DNA damage and cell differentiation. *J Cell Sci.* 2010; 123 (14): 2423–33.