

НОКАУТ МУТАНТНОГО *TP53* В КЛЕТКАХ ЛИНИИ НАСАТ УСИЛИВАЕТ ИХ МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬП. М. Кожин<sup>1</sup>, Д. Д. Ромашин<sup>1</sup>, А. Л. Русанов<sup>1</sup>✉, Н. Г. Лузгина<sup>1</sup><sup>1</sup> Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Линия HaCaT — спонтанно иммортализованные неканцерогенные кератиноциты человека, широко используемые в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека. В геноме клеток HaCaT присутствуют две аллели гена *TP53*, которые содержат две gain-of-function (GOF) мутации, приобретенные в результате спонтанной иммортализации (*mutTP53*). Наличие мутаций приводит к увеличению скорости пролиферации и нарушению программы стратификации. Целью исследования было изучить влияние нокаута гена *mutTP53* на способность кератиноцитов линии HaCaT к пролиферации и миграции в модели повреждения и регенерации эпидермиса *in vitro* (скретч-тест), а также на способность формировать многослойный эпителий в органотипической модели эпидермиса. Для проведения скретч-теста клетки культивировали до образования монослоя, затем наносили стандартизованное повреждение. Органотипическую модель получали культивированием кератиноцитов в поликарбонатных мембранных вставках с диаметром пор 0,4 мкм на границе раздела фаз (воздух-жидкость). Продемонстрировано, что нокаут мутантного гена *TP53* приводит к увеличению миграционной способности кератиноцитов линии HaCaT: для HaCaT с нокаутом *mutTP53* закрытие дефекта происходило быстрее по сравнению с соответствующей группой WT HaCaT ( $p < 0,05$ ), на третьи сутки размер дефекта составлял  $12\% \pm 3\%$  и  $66\% \pm 5\%$  от первоначального. Получены данные, что мутантный *TP53* в клетках HaCaT является негативным регулятором экспрессии ламинина-5 (экспрессия *LAMC2* была выше в клетках с нокаутом *mutTP53* в  $9,96 \pm 1,92$  раз,  $p < 0,05$ ), однако это не способствует нормализации программы дифференцировки и стратификации эпителия с образованием рогового слоя в органотипической модели.

**Ключевые слова:** HaCaT, дифференцировка кератиноцитов, p53, CRISPR/Cas9, нокаут, миграция**Финансирование:** работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).**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 — планирование и проведение исследования; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — анализ и интерпретация полученных данных; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин — подготовка текста статьи; П. М. Кожин, Д. Д. Ромашин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов — редактирование рукописи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и всех ее пересмотров.✉ **Для корреспонденции:** Александр Леонидович Русанов  
ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, г. Москва, 119121, Россия; alexander.l.rusanov@gmail.com**Статья получена:** 09.12.2022 **Статья принята к печати:** 24.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.070KNOCKOUT OF MUTANT *TP53* IN THE HACAT CELLS ENHANCES THEIR MIGRATION ACTIVITYKozhin PM<sup>1</sup>, Romashin DD<sup>1</sup>, Rusanov AL<sup>1</sup> ✉, Luzgina NG<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

The HaCaT cell line represents the spontaneously immortalized non-carcinogenic human keratinocytes that are used as a model for studying the function of normal human keratinocytes. There are two *TP53* alleles in the HaCaT cell genome, which comprise two gain-of-function (GOF) mutations acquired through spontaneous immortalization (*mutTP53*). Mutations result in the increased proliferation rate and violation of the stratification program. The study was aimed to assess the effects of the *mutTP53* gene knockout on the HaCaT keratinocytes capability of proliferation and migration in the *in vitro* model of epidermal injury and regeneration (scratch test), and on the ability to form stratified epithelium in the organotypic epidermal model. To perform the scratch-test, cells were cultured until monolayer was formed, then the standardized wound was created. The organotypic model was obtained by growing keratinocytes in the polycarbonate membrane inserts with the pore size of 0.4  $\mu\text{m}$  at the interface between the phases (air-liquid). It has been shown that the mutant *TP53* gene knockout results in the increased migration capability of the HaCaT keratinocytes: in the *mutTP53* knockout HaCaT, the defect closure occurred faster than in the appropriate group of the WT HaCaT ( $p < 0.05$ ), on day three the defect size was  $12\% \pm 3\%$  and  $66\% \pm 5\%$  of the initial size. There is evidence that mutant *TP53* in the HaCaT cells is a negative regulator of the laminin-5 expression (*LAMC2* expression was  $9.96 \pm 1.92$  times higher in the cells with the *mutTP53* knockout,  $p < 0.05$ ), however, this does not promote normalization of the program of epithelial differentiation and stratification followed by formation of the stratum corneum in the organotypic model.

**Keywords:** HaCaT, keratinocyte differentiation, p53, CRISPR/Cas9, knockout, migration**Funding:** the study was carried out as part of the Program for fundamental research in the Russian Federation for the long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).**Author contribution:** Luzgina NG, Rusanov AL — study concept; Romashin DD, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL — study design and literature review; Romashin DD, Kozhin PM — 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, Luzgina NG, Rusanov AL — manuscript editing.**Compliance with ethical standards:** the study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association and all its revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander L. Rusanov  
Pogodinskaya, 10, str. 8, Moscow, 119121, Russia; alexander.l.rusanov@gmail.com**Received:** 09.12.2022 **Accepted:** 24.12.2022 **Published online:** 30.12.2022**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.070

Линия HaCaT (спонтанно иммортализованные неканцерогенные кератиноциты человека) получила широкое распространение в качестве модели для изучения функций нормальных кератиноцитов человека [1, 2]. Однако

в кератиноцитах линии HaCaT нарушены программа стратификации и экспрессия маркеров дифференцировки [3]. Известно, что в геноме кератиноцитов HaCaT присутствуют два аллеля гена *TP53* (H179Y и R282Q),

которые содержат две gain-of-function (GOF) мутации, приобретенные в результате спонтанной иммортализации (*mutTP53*) [4]. *mutTP53* 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 [5]. Известно, что мутантный p53 действует как минимум двумя путями: влияет на функцию p63/p73, ингибируя их связывание с ДНК [6], или сам связывается с новыми сайтами ДНК, взаимодействуя с другими транскрипционными факторами (NF- $\kappa$ B, E2F1, NF-KB, VDR, p63) [7, 8].

Среди базовых физиологических характеристик клеток линии HaCaT наибольший интерес представляют: пролиферация, миграция, стратификация и образование трехмерных органотипических структур.

Ранее нами показано, что изменение активности *mutp53* в клетках HaCaT приводит к изменению экспрессии маркеров дифференцировки (в частности, каспазы 14, инволюкрин и транслугтаминазы-1) и сопровождается изменением экспрессии p63 [9].

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 клеток с *mutTP53* позволяет получить новые данные для исследования канцерогенеза [10, 11].

Целью исследования было изучить особенности изменения миграционной способности клеток HaCaT при нокауте гена *mutTP53*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточные линии и условия культивирования

Клеточная линия HaCaT была приобретена в коллекции клеточных культур German Cancer Research Center (DKFZ, Heidelberg; Германия). Клеточная культура кератиноцитов HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53) была получена ранее [13]. Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в среде DMEM/F12 (1:1, Gibco; США) с добавлением 1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific; США), раствора пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки («Диа-М»; Россия).

Клеточная культура нормальных кератиноцитов человека (NHK, пул из пяти доноров) приобретена в ООО НПО «Перспектива» (Новосибирск, Россия). Клетки культивировали при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в среде Keratinocyte SFM (Gibco; США), содержащей 1% GlutaMAX (Gibco; США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco; США), 50 мкг/мл BPE (Gibco; США), 10 нг/мл EGF (Gibco; США).

Клетки выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см<sup>2</sup> или в чашках Петри диаметром 60 мм (Corning; США). Среду заменяли на свежую каждый второй день культивирования.

### Анализ клеточного цикла

Клеточный цикл исследовали по включению Edu (Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488; ThermoFisher, США) и количеству ДНК по окраске Propidium Iodide (PI) (Sigma; США). Клетки рассаживали в лунки шестилуночного планшета и культивировали до достижения 50% конfluence. Затем к клеткам добавляли Edu и производили окраску

согласно рекомендациям производителя. Инкубировали с раствором PI/Казазы 100 мкг/мл и PI 1 мкг/мл в течение 30 мин. Детекцию производили с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad; США) и программного обеспечения Everest 2.4.0.1365 (Bio-Rad; США).

Высоко позитивное окрашивание по Edu характерно для клеток, находящихся в S-фазе. Высоко позитивное окрашивание по PI характерно для клеток с удвоенным количеством ДНК, находящихся в G<sub>2</sub>/M-фазе клеточного цикла.

### Сравнение скорости пролиферации клеток

Сравнения скорости пролиферации клеток линии HaCaT дикого типа (WT) и с нокаутом *mutTP53* (dp53) проводили с помощью CytoTrace Red CMTPX (AAT Bioquest; США). Клетки рассаживали в лунки шестилуночного планшета и культивировали до достижения 50% конfluence. Затем клетки окрашивали CellTracer (согласно рекомендациям производителя), культивировали в течение 24 ч. Детекцию производили с помощью проточного цитофлуориметра ZE5 (Bio-Rad; США) и программного обеспечения Everest 2.4.0.1365 (Bio-Rad; США). Уменьшение интенсивности флуоресценции (разбавление метки) отражает количество клеточных делений.

### Scratch-тест: оценка скорости зарастания дефекта монослоя клеток

Для проведения scratch-теста в лунки 24-луночного планшета вносили по 50 тыс. клеток HaCaT дикого типа (WT), с нокаутом *mutTP53* (dp53) или нормальные кератиноциты человека (NHK) и преинкубировали в полной культуральной среде при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> до образования монослоя в лунке. Затем наносили стандартизованное повреждение монослоя с помощью пластмассового скребка, промывали клетки раствором DPBS и культивировали далее в полной культуральной среде в течение трех суток. Каждую лунку фотографировали по всей длине повреждения ежедневно. Обработку фотографий проводили с использованием библиотеки skimage [12]. Вычисляли площадь, не занятую клетками (площадь дефекта), через 0, 24, 48 и 72 ч после нанесения дефекта и находили соотношение по сравнению с начальной площадью дефекта (относительная площадь дефекта). Эксперимент проводили в трех повторах.

### Протеомные данные

Анализ полученных нами ранее протеомных данных [13], депонированных в ProteomeXchange Consortium (адрес доступа <http://proteomecentral.proteomexchange.org/cgi/GetDataset?ID=PX030700>), производили с помощью ПО MaxQuant (v1.6.3.4). Было проанализировано по три биологических повтора для каждой линии (клетки линии HaCaT дикого типа и с нокаутом гена *mutTP53*) в трех технических повторах.

### Определение уровня экспрессии генов

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 набор MMLV RT kit («Евроген»; Россия) по стандартному протоколу, добавляя в реакцию

Таблица 1. Использованные праймеры

Ген	Последовательность праймеров
<i>GAPDH</i>	Forward 5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT-3' Reverse 5'-ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT-3'
<i>LAMB3</i>	Forward 5'-TGGCTGAAGATGAGACCATTС-3'; Reverse 5'-GGTAGATGAAGCTCGGAGAAAC-3'
<i>LAMC2</i>	Forward 5'-TGGATGAGTTCAAGCGTACAC-3'; Reverse 5'-CTTTTAGCAAGATTGGCACGG-3'

по 1 мкг РНК. qPCR проводили, используя qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Для каждого гена и каждого образца реакцию проводили в трех повторах. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*. Используемые праймеры представлены в табл. 1.

### Формирование многослойного кожного эквивалента

Для формирования органотипической модели клетки HaCaT дикого типа (WT), с нокаутом *mutTP53* или нормальные кератиноциты человека (NHK) выращивали в поликарбонатных мембранных вставках Millipore PIPPO1250 с диаметром пор 0,4 мкм в формате 24-луночного планшета. Мембранные вставки помещали в лунки планшета, после чего вносили в апикальный отдел по 700 тыс. клеток линии HaCaT (дикого типа или клеток с нокаутом *mutTP53*) и 700 мкл среды Submerge (EpiLife (Gibco; США), содержащей 1% GlutaMAX (Gibco; США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco; США), 1% HKGS (Gibco; США), 10 нг/мл EGF (Gibco; США) и 1,5 мМ CaCl<sub>2</sub> (Sigma; США) в базолатеральный отдел. Клетки инкубировали в течение 24 ч (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) для прикрепления клеток и активации пролиферации. Спустя 24 ч полностью удаляли среду из апикального отдела и заменяли среду в базолатеральном отделе на 450 мкл среды для культивирования на границе раздела фаз (ALI-medium: Submerge + 10 нг/мл KGF (Gibco; США) и 1 мМ L-аскорбиновой кислоты (Sigma; США)). Клетки культивировали в течение 10 суток, ежедневно заменяя среду на свежую.

### Иммунофлуоресцентное окрашивание

Полученные клеточные модели фиксировали в 4%-м формалине. Подвергали стандартной гистологической обработке: дегидратировали в серии спиртов с возрастающей концентрацией, заключали в парафиновые блоки, срезы изготавливали с помощью микротом.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки инкубировали с первичными антителами к KRT5 (ab52635;

Abcam, США), CK10 (ab9025; Abcam, США) и вторичными Alexa Fluor 488-конъюгированными (ab150105; Abcam, США) или Texas Red-конъюгированными (ab6793; Abcam, США) антителами. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно с использованием единого набора реактивов (разведений антител и буферов).

### Определение величины электрического сопротивления

Для определения величины электрического сопротивления (TEER) моделей кожи, полученных на основе разных клеток, использовали вольтметр EVOM (World Precision Instruments, Inc.; США). Для этого заменяли питательную среду в базальном отсеке на 0,9% NaCl, и в апикальный отсек мембранной вставки добавляли 300 мкл 0,9% NaCl. Затем помещали электроды в апикальный и базолатеральный отсеки мембранной вставки и измеряли уровень сопротивления (TEER) мембранной вставки с культивируемыми клетками (кожного эквивалента).

### Анализ данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R [14]. Различия величин анализируемого параметра между группами определяли с помощью *t*-критерия с поправкой Бунджамини-Хохберга на множественное сравнение. Статистически значимыми различия считали при  $p < 0,05$ . Данные представлены в виде  $M \pm m$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании пула активно пролиферирующих клеток по включению Edu (аналога BrdU) в ДНК было определено, что HaCaT дикого типа пролиферируют активнее, чем клетки с нокаутом *mutTP53*. В S-фазе у клеток дикого типа (HaCaT WT) наблюдалось в среднем  $45,6 \pm 3,2\%$  клеток, в то время как у клеток с нокаутом *mutTP53* (HaCaT dp53)

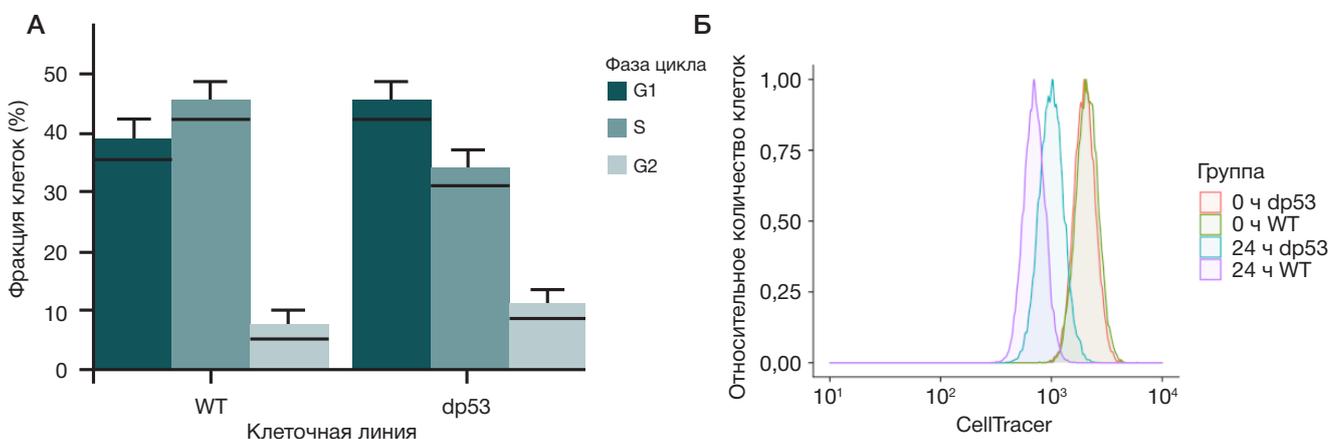
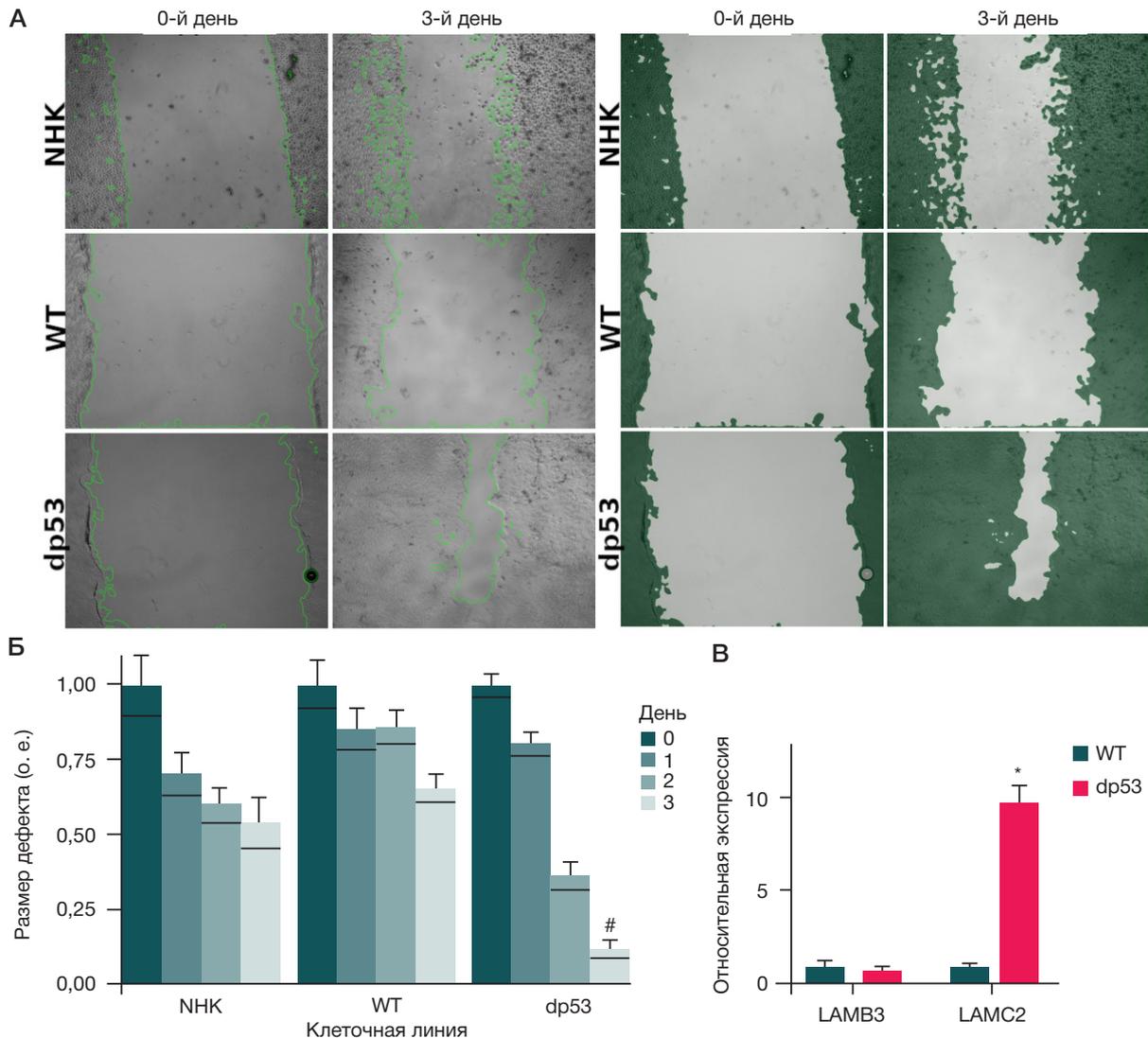


Рис. 1. Пролiferативная активность клеток HaCaT. А. Распределение клеток HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53) по фазам клеточного цикла. Б. Пролiferативная активность клеток HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53)



**Рис. 2.** Scratch-test. Скорость заполнения дефекта монослоя разными типами клеток: нормальные кератиноциты (NHK), клетки HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* (dp53). **А.** Световая микроскопия; ув.  $\times 40$ ; 0-й день (сразу после нанесения) и 3 дня после нанесения дефекта. **Б.** Обобщенная диаграмма относительной площади дефекта на 1-й, 2-й, 3-й день после нанесения дефекта. **В.** Относительная экспрессия генов *LAMB3*, *LAMC2*. \* — значимые различия по сравнению с HaCaT дикого типа ( $p < 0,05$ ); # — значимые различия по сравнению с NHK в соответствующий день ( $p < 0,05$ )

$34,1 \pm 2,9\%$  (рис. 1). Эти данные также подтверждаются результатами разбавления метки CellTracer после 24 ч культивирования.

В Scratch-тесте закрытие дефекта линиями NHK и WT HaCaT происходило практически с одинаковой скоростью. На третьи сутки осталось  $54\% \pm 9\%$  и  $66\% \pm 5\%$  от первоначальной площади дефекта для NHK и WT HaCaT соответственно. В то время как для HaCaT с нокаутом *mutTP53* наблюдалось значительное увеличение скорости закрытия дефекта и на третьи сутки осталось  $12\% \pm 3\%$  ( $p < 0,05$  по сравнению с соответствующей группой WT HaCaT) от его первоначальной площади (рис. 2А, Б).

Ранее было проведено сравнительное панорамное протеомное исследование клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом гена *mutTP53* [13]. При анализе данных было идентифицировано 2080 белков по двум или более пептидам (исключены потенциальные контаминанты, белки, идентифицированные по одному сайту, ложноположительные определения). Из идентифицированных белков 27 имели достоверно различную экспрессию между анализируемыми линиями ( $FDR < 0,05$ ). Наибольший интерес представляет изменение экспрессии белков *LAMC2*, *LAMB3*: она была значительно

выше в клетках с нокаутом *mutTP53* (в 4,95 и 4,58 раз соответственно).

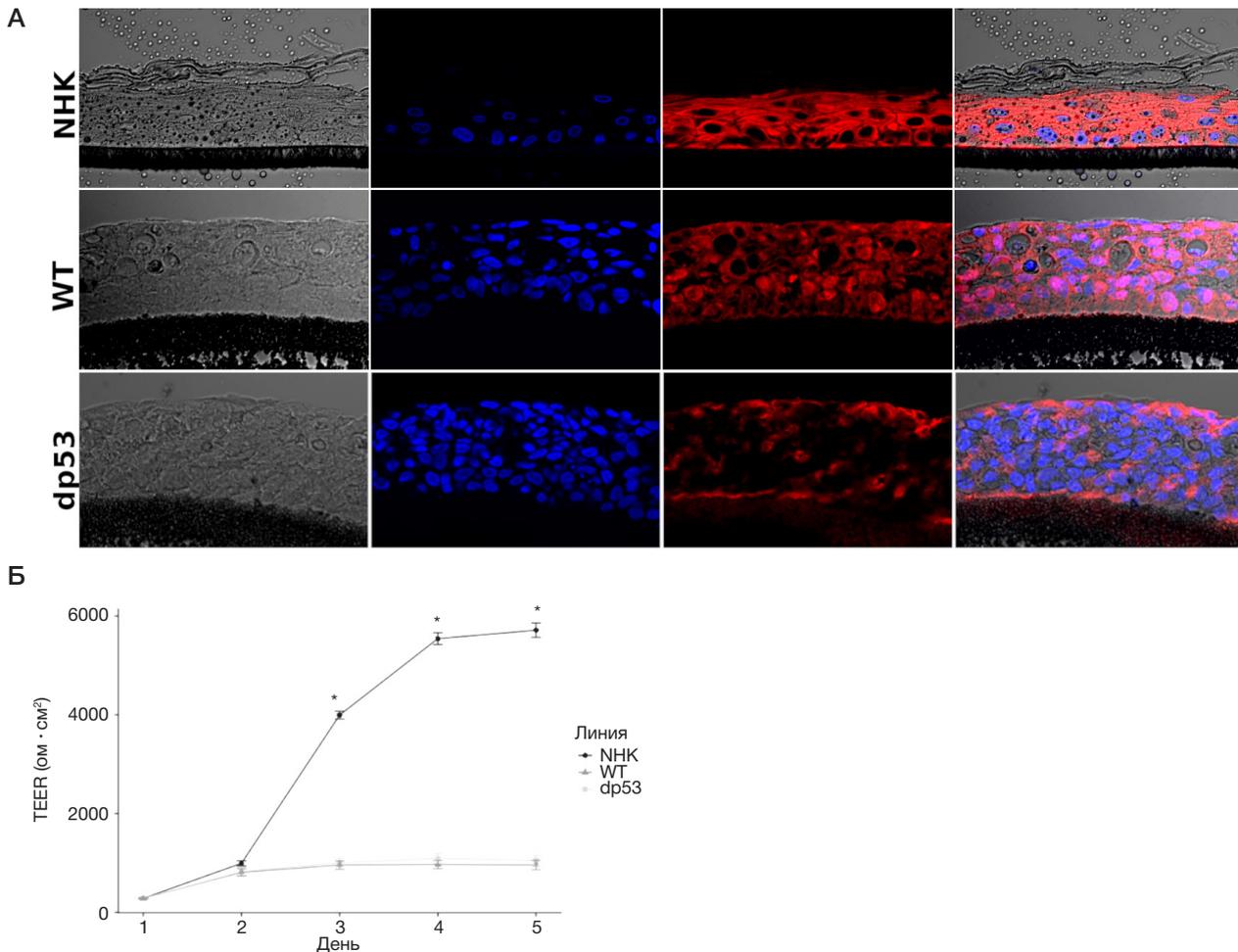
Данные протеомного исследования в отношении *LAMC2* подтверждают результаты ПЦР-РВ (рис. 2): экспрессия *LAMC2* была значительно выше в клетках с нокаутом *mutp53* ( $9,96 \pm 1,92$ ,  $p < 0,05$ ). В то время как достоверных различий в экспрессии гена *LAMB3* в анализируемых линиях не зафиксировано.

При культивировании 3D-культур все три линии образовывали многослойный кожный эквивалент (рис. 3А). Однако стратификация, типичная для клеток нормального эпидермиса человека, и образование рогового слоя выявлены только для нормальных кератиноцитов (NHK).

В органотипической модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов человека (NHK) присутствовал хорошо выраженный роговой слой.

В органотипической модели эпидермиса из кератиноцитов HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом *mutTP53* четкой стратификации клеток и образования рогового слоя не наблюдалось. Экспрессию *KRT5* наблюдали во всех слоях, она была сопоставимой (рис. 3А).

При измерении трансэпителиального электрического сопротивления в органотипической модели эпидермиса из



**Рис. 3.** Формирование многослойного кожного эквивалента кератиноцитами разных линий: нормальные кератиноциты (NHK), клетки HaCaT дикого типа (WT) и HaCaT с нокаутом гена *mutTP53* (dp53). **А.** Иммунофлуоресцентная микроскопия. Окраска: ядра (DAPI) — синий, KRT5 — красный; ув  $\times 400$ . **Б.** Значения трансэпителиального сопротивления (TEER). \* — значимые различия по сравнению с WT в соответствующий день ( $p < 0,005$ )

нормальных кератиноцитов наблюдалось его возрастание на протяжении всего периода наблюдения.

Органотипические модели эпидермиса из разных типов клеток различались как по максимальным значениям трансэпителиального сопротивления, так и по его динамике в течение пяти дней (рис. 3Б).

Наибольшее значение трансэпителиального сопротивления (TEER) обнаружено у моделей эпидермиса из нормальных кератиноцитов (NHK) —  $5712 \pm 146$  Ом·см<sup>2</sup>. У моделей из кератиноцитов линии HaCaT дикого типа и с нокаутом *mutTP53* значение TEER было ниже почти в 5 раз:  $964 \pm 82$  и  $1088 \pm 91$  соответственно ( $p < 0,05$  по сравнению с клетками NHK).

Быстрее всего трансэпителиальное сопротивление возрастало в органотипической модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов человека со второго по четвертый день, с дальнейшим выходом на плато. Величина данного показателя в моделях эпидермиса из кератиноцитов линии HaCaT дикого типа или с нокаутом *mutTP53*, по сравнению с моделью из NHK, имело меньшее значение и выходило на плато уже на вторые сутки.

Увеличение трансэпителиального потенциала связывают с образованием межклеточных контактов и стратификацией эпителия с образованием рогового слоя [15], который наблюдался в модели эпидермиса из нормальных кератиноцитов и отсутствовал в моделях из кератиноцитов HaCaT вне зависимости от наличия нокаута *mutTP53* (рис. 3А).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что мутантная форма p53 в клетках HaCaT ассоциирована с повышенной скоростью роста и пролиферации клеток, что было подтверждено экспериментально более ранними исследованиями [5], а также неспособностью клеток к нормальной дифференцировке с образованием полноценного рогового слоя.

Согласно данным сравнительного протеомного исследования первичных кератиноцитов человека и кератиноцитов линии HaCaT, одним из наиболее заметных отличий клеток является значительно сниженная в клетках HaCaT экспрессия субъединиц комплекса ламинина-5: цепей  $\alpha 3$ ,  $\beta 3$  и  $\gamma 2$  (LAMA3, LAMB3, LAMC2) [16]. Обсуждая полученные результаты, авторы указанной работы сделали предположение, что эта особенность определяет дефектность программы дифференцировки клеток HaCaT.

Ламинины представляют собой основной компонент внеклеточного матрикса и играют важную роль в клеточной адгезии, дифференцировке, передаче сигнала [17]. Комплекс ламинин-5 необходим для стабилизации контактов между эпидермисом и дермой за счет связывания с интегринами  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  и коллагеном VII типа. Также ламинин-5 играет важную роль при миграции клеток. Показано, что снижение экспрессии гена ламинина-5 в кератиноцитах приводит к снижению

их адгезии и нарушению регенерации эпидермиса [18]. Однако повышение экспрессии субъединиц LAMB3 и LAMC2 часто отмечают при онкологических процессах. В результате, опухолевые клетки характеризуются более высокой скоростью миграции и инвазивностью [19].

Согласно полученным нами данным, нокаут гена *mutTP53* в клетках HaCaT действительно приводил к увеличению экспрессии LAMB3 и LAMC2 (данные протеомного исследования клеток). Стоит, однако, отметить, что скорость восстановления дефекта в скрэтч-тесте у нормальных кератиноцитов и клеток HaCaT дикого типа на третий день после повреждения не имела достоверных различий, в то время как у клеток с нокаутированным *mutTP53* данный показатель был значительно выше. Высокую скорость заполнения дефекта в скрэтч-тесте клетками HaCaT с нокаутом *mutTP53* следует связывать именно с их повышенной миграционной активностью, а не с интенсивностью пролиферации, которая в данных клетках была существенно ниже, чем в клетках HaCaT дикого типа.

По-видимому, наличие мутаций в гене *TP53* не влияет значительно на его способность регулировать процессы миграции, в то время как при его инактивации (нокауте), миграционная способность клеток значительно возрастает, в том числе, в сравнении с нормальными кератиноцитами человека, в результате чего клетки HaCaT

с нокаутированным *mutTP53* приобретают черты клеток с «проканцерогенным фенотипом».

Отметим также, что увеличение экспрессии ламинина-5 в результате нокаута гена *mutTP53* никак не сказалось на способности кератиноцитов линии HaCaT образовывать полноценный стратифицированный эпителий в органотипической модели эпидермиса. Это выражалось в отсутствии сформированного рогового слоя и низком уровне трансэпителиального сопротивления (TEER), сопоставимыми с таковыми у клеток дикого типа.

Таким образом, полученные нами данные подтверждают регулируемую роль мутантного p53 в клетках HaCaT в отношении экспрессии ламинина 5, но не позволяют связать низкий уровень его экспрессии с нарушением программы дифференцировки данных клеток.

## ВЫВОДЫ

Мутантный *TP53* в клетках HaCaT является негативным регулятором экспрессии ламинина 5. Нокаут гена *mutTP53* приводит к увеличению миграционной активности клеток HaCaT, но не способствует нормализации программы дифференцировки. Полученные данные дополняют сведения о функциональных особенностях мутантного *TP53* в клетках HaCaT.

## Литература

- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4. DOI:10.1186/s41702-019-0054-y.
- 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): 620–22. DOI: 10.1007/s10517-017-3863-2.
- Smits JPH, Niehues H, Rikken G, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11838. DOI: 10.1038/s41598-017-12041-y.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14 (5): 833–9. DOI: 10.1093/carcin/14.5.833.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012; 3 (2): 132–43. DOI: 10.18632/oncotarget.447.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7 (5): 285–95. DOI: 10.1038/nchembio.546.
- Cordani N, Pozzi S, Martynova E, et al. Mutant p53 subverts p63 control over KLF4 expression in keratinocytes. *Oncogene.* 2011; 30 (8): 922–32. DOI: 10.1038/onc.2010.474.
- Neilsen PM, Noll JE, Suetani RJ, et al. Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome. *Oncotarget.* 2011; 2 (12): 1203–17. DOI: 10.18632/oncotarget.382.
- Русанов А. Л., Кожин П. М., Ромашин Д. Д., Карагяур М. Н., Лузгина Н. Г. Влияние модуляции активности p53 на взаимодействие членов семейства p53 в процессе дифференцировки кератиноцитов линии HaCaT. *Вестник РГМУ.* 2020; (6): 60–67. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.082.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223 (2): 116–26. DOI: 10.1002/path.2784.
- Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192 (2): 209. DOI: 10.1083/jcb.201009059.
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ.* 2014; 2: e453. DOI: 10.7717/peerj.453.
- Rusanov AL, Romashin DD, Kozhin PM, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data.* 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw.* 2019; 4: 1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Rusanov AL, Luzgina ED, Vakhrushev IV, Nakhod KV, Luzgina NG. A Cell Model of Human Small Intestinal Wall Based on Genetically Modified Caco-2 Cells. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 166 (1): 174–7. DOI: 10.1007/s10517-018-4308-2.
- Sprenger A, Weber S, Zarai M, et al. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2013; 12 (9): 2509–21. DOI: 10.1074/mcp.M112.025478.
- Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adhes Migr.* 2013; 7 (1): 122–34. DOI: 10.4161/cam.23132.
- Natsumi A, Sugawara K, Yasumizu M, et al. Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions: Is Laminin-511 a New Player in Psoriasis Pathogenesis? *J Histochem Cytochem.* 2018; 66 (12): 847–62. DOI: 10.1369/0022155418782693.
- Huang C, Chen J. Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 2021; 23 (1): 11. DOI: 10.3892/mmr.2020.11649.

## References

- Petushkova NA, Rusanov AL, Pyatnitskiy MA, et al. Proteomic characterization of HaCaT keratinocytes provides new insights into changes associated with SDS exposure. *Biomed Dermatol.* 2020; 4 (1): 4. DOI:10.1186/s41702-019-0054-y.
- 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): 620–22. DOI: 10.1007/s10517-017-3863-2.
- Smits JPH, Niehues H, Rikken G, et al. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 11838. DOI: 10.1038/s41598-017-12041-y.
- Lehman TA, Modali R, Boukamp P, et al. p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines. *Carcinogenesis.* 1993; 14 (5): 833–9. DOI: 10.1093/carcin/14.5.833.
- Martynova E, Pozzi S, Basile V, et al. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63. *Oncotarget.* 2012; 3 (2): 132–43. DOI: 10.18632/oncotarget.447.
- Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol.* 2011; 7 (5): 285–95. DOI: 10.1038/nchembio.546.
- Cordani N, Pozzi S, Martynova E, et al. Mutant p53 subverts p63 control over KLF4 expression in keratinocytes. *Oncogene.* 2011; 30 (8): 922–32. DOI: 10.1038/onc.2010.474.
- Neilsen PM, Noll JE, Suetani RJ, et al. Mutant p53 uses p63 as a molecular chaperone to alter gene expression and induce a pro-invasive secretome. *Oncotarget.* 2011; 2 (12): 1203–17. DOI: 10.18632/oncotarget.382.
- Rusanov AL, Kozhin PM, Romashin DD, Karagyaur MN, Luzgina NG. Impact of p53 modulation on interactions between p53 family members during HaCaT keratinocytes differentiation. *Bulletin of RSMU.* 2020; (6): 58–65. DOI: 10.24075/brsmu.2020.082.
- Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J Pathol.* 2011; 223 (2): 116–26. DOI: 10.1002/path.2784.
- Muller PAJ, Vousden KH, Norman JC. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *J Cell Biol.* 2011; 192 (2): 209. DOI: 10.1083/jcb.201009059.
- van der Walt S, Schönberger JL, Nunez-Iglesias J, et al. scikit-image: image processing in Python. *PeerJ.* 2014; 2: e453. DOI: 10.7717/peerj.453.
- Rusanov AL, Romashin DD, Kozhin PM, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data.* 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, et al. Welcome to the Tidyverse. *J Open Source Softw.* 2019; 4: 1686. DOI: 10.21105/joss.01686.
- Rusanov AL, Luzgina ED, Vakhrushev IV, Nakhod KV, Luzgina NG. A Cell Model of Human Small Intestinal Wall Based on Genetically Modified Caco-2 Cells. *Bull Exp Biol Med.* 2018; 166 (1): 174–7. DOI: 10.1007/s10517-018-4308-2.
- Sprenger A, Weber S, Zarai M, et al. Consistency of the proteome in primary human keratinocytes with respect to gender, age, and skin localization. *Mol Cell Proteomics MCP.* 2013; 12 (9): 2509–21. DOI: 10.1074/mcp.M112.025478.
- Rousselle P, Beck K. Laminin 332 processing impacts cellular behavior. *Cell Adhes Migr.* 2013; 7 (1): 122–34. DOI: 10.4161/cam.23132.
- Natsumi A, Sugawara K, Yasumizu M, et al. Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions: Is Laminin-511 a New Player in Psoriasis Pathogenesis? *J Histochem Cytochem.* 2018; 66 (12): 847–62. DOI: 10.1369/0022155418782693.
- Huang C, Chen J. Laminin-332 mediates proliferation, apoptosis, invasion, migration and epithelial-to-mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 2021; 23 (1): 11. DOI: 10.3892/mmr.2020.11649.