

На правах рукописи

Ромашин Даниил Дмитриевич

Функции мутантного p53 в кератиноцитах HaCaT

1.5.4. – «Биохимия»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории прецизионных биосистем ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель: кандидат химических наук
Русанов Александр Леонидович

Официальные оппоненты: **Воробьев Иван Иванович**,
доктор биологических наук,
ФИЦ «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»,
главный научный сотрудник, заведующий
лабораторией

Татарский Виктор Вячеславович,
кандидат биологических наук,
ФГБУН Институт биологии гена Российской
академии наук, старший научный сотрудник,
заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта Российской
академии наук.

Защита состоится «5» декабря 2024 г. в 15 часов на заседании диссертационного
совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном
научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской
химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10,
стр. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ и на сайте
www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Карпова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Транскрипционный фактор p53 кодируется геном *TP53* и является одним из ключевых регуляторов клеточного цикла. Основной биологической функцией p53 является поддержание стабильности и однородности генома посредством элиминации клеток с нарушенной целостностью генетического материала. Активация p53 приводит к остановке клеточного цикла для репарации повреждений, индукции апоптоза или терминальной дифференцировки.

Мутации в *TP53* встречаются в более чем 50% злокачественных опухолей. Превалирующими мутациями в *TP53* являются миссенс-мутации в ДНК-связывающем домене (ДСД), в особенности – в кодонах R175, R213, G245, R248, R273 и R282. Разные варианты мутаций гена приводят с различной степени угнетения/изменения функций кодируемого белка. Так, p53^{R175C} сохраняет все свойства белка дикого типа, p53^{R175P} активен в отношении регуляции клеточного цикла, но не способен индуцировать апоптоз в клетках аденокарциномы легкого H1299, а p53^{R175H} полностью утрачивает каноничные функции и приводит к прогрессии рака поджелудочной железы.

Кожа человека подвергается УФ-излучению, которое оказывает существенное генотоксическое действие. Если повреждения ДНК не устраняются механизмами репарации, УФ-излучение может приводить к появлению «УФ-сигнатурных мутаций» в *TP53* (C→T и CC→TT в дипиримидиновых участках). Подобные мутации обнаруживаются в большинстве случаев плоскоклеточной карциномы кожи (54-90%) и способствуют прогрессии опухоли. УФ-индуцированные мутации в *TP53* являются ранними генетическими изменениями в процессе канцерогенеза и приводят к потере каноничных функций p53. В большинстве карцином кожи встречаются миссенс-мутации R248W и R175H, в результате которых синтезируется полноразмерный белок с нарушенными функциями. При карциномах легкого, кишечника и мочевого пузыря часто наблюдается потеря одной из аллелей *TP53*, однако, такие случаи нехарактерны для карцином кожи. При плоскоклеточной и базальной карциноме кожи чаще возникают независимые мутации в обеих аллелях *TP53*.

Клетки HaCaT – спонтанно-иммортизированные неопухолевые кератиноциты человека. Данная HaCaT широко используется на протяжении нескольких десятилетий и лежит в основе некоторых клеточных моделей, стандартизованных организацией экономического сотрудничества и развития (OECD) и регламентированных ГОСТ РФ. Клетки данной линии имеют фенотип нормальных кератиноцитов, экспрессируют маркеры эпидермальной дифференцировки в ответ на стимулы и в определенных условиях способны к формированию стратифицирующего слоя *in vivo*. При этом, клетки данной линии несут независимые УФ-сигнатурные мутации в обоих аллелях *TP53* (R282Q и H179Y). Мутации аналогичного характера также часто встречаются в случаях плоскоклеточной карциномы кожи.

Инактивация гена является эффективным инструментом для исследования свойств кодируемого белка. Путем нокдауна гена *TP53* в HaCaT ранее было установлено, что мутантный p53 в HaCaT функционален в отношении контроля клеточного цикла и индукции апоптоза, но обладает атипичной транскрипционной активностью, что приводит к усилению пролиферации клеток. При этом, авторы не исследовали активность p53^{R282Q/H179Y} в отношении дифференцировки и эпителиально-мезенхимального перехода. Однако, нокдаун гена не позволяет добиться полной инактивации гена, что, принимая во внимание высокую транскрипционную активность p53, является ограничивающим фактором. В то же время, полная инактивация белка p53 в клетках HaCaT с использованием CRISPR-интерференции может расширить представление о его роли в различных физиологических процессах в кератиноцитах, включая реализацию его онкосупрессорных функций. Кроме того, в связи с тем, что характер мутаций в *TP53* в HaCaT типичен для кератиноцитов, подвергнутых воздействию УФ-излучения, представляет интерес оценка онкосупрессорных функций p53^{R282Q/H179Y}.

Целью настоящей работы являлась комплексная характеристика функциональных особенностей мутантной формы белка p53^{R282Q/H179Y} в кератиноцитах линии HaCaT.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) С использованием методов геномного редактирования получить новую клеточную линию HaCaT с нокаутом *TP53*;

- 2) Выполнить молекулярное профилирование полученной линии с использованием методов транскриптомного и протеомного анализа;
- 3) Исследовать способность мутантного $p53^{R282Q/H179Y}$ к регуляции пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки в кератиноцитах HaCaT;
- 4) Охарактеризовать участие мутантного $p53^{R282Q/H179Y}$ в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода.

Научная новизна работы

Впервые была получена новая линия кератиноцитов HaCaT со стабильным нокаутом *TP53*. Впервые было выполнено комплексное исследование особенностей протеома и транскриптома клеток HaCaT дикого типа и с инактивированным $p53^{R282Q/H179Y}$. В том числе, впервые проведена оценка дифференциальной экспрессии длинных некодирующих РНК в клетках HaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*. С использованием методов транскриптомного анализа впервые было установлено, что инактивация $p53^{R282Q/H179Y}$ приводит к увеличению генов, ассоциированных с миграцией и инвазией (*LPXN*, *DLC-1*, *MMP13*, *LCP-1*), репрессии ключевых маркеров эпидермальной дифференцировки (*IVL*, *KRT1*, *KRT10*), активации эпителиально-мезенхимального перехода и увеличению экспрессии *CD274* (PD-L1). Было показано, что инактивация $p53^{R282Q/H179Y}$ приводит к увеличению экспрессии белков фокальных контактов (*ITGA2*, *ITGA6*, *ZYX*) и ГТФаз семейства Rab. Ключевые результаты молекулярного профилирования были верифицированы с помощью функциональных тестов. В частности, способность к реализации онкосупрессорной активности $p53^{R282Q/H179Y}$ впервые была подтверждена экспериментально.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что CRISPR-интерференция с использованием мутантной нуклеазы Cas9^{D10A} в сочетании с парными направляющими РНК позволяет выполнить стабильную инактивацию целевого гена в клетках с анеуплоидным хромосомным набором. Полученная линия с нокаутом *TP53* может быть использована в дальнейших исследованиях функциональных особенностей $p53^{R282Q/H179Y}$. С использованием методов транскриптомного и протеомного анализа, а также функциональных тестов, получены новые сведения о

функциональных особенностях мутантного p53^{R282Q/H179Y}. Установлено, что несмотря на наличие мутаций, p53^{R282Q/H179Y} сохраняет онкосупрессорную активность в отношении репрессии эпителиально-мезенхимального перехода, а также выполняет регуляторную роль в процессе эпидермальной дифференцировки. Полученные сведения могут иметь значение для понимания роли отдельных мутаций TP53 в процессе канцерогенеза. В связи с тем, что мутации R282Q/H179Y в TP53 часто встречаются при раке кожи, новые сведения о функциональных особенностях p53^{R282Q/H179Y} могут иметь значимость в контексте диагностики и терапии онкологических заболеваний кожи.

Полученные сведения также могут быть полезны при интерпретации данных, полученных на клетках HaCaT и их экстраполяции на нормальные кератиноциты человека и эпидермис *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Использование системы редактирования генома CRISPR/Cas9^{D10A} с парными направляющими РНК позволяет обеспечить стабильную инактивацию TP53 в анеуплоидной линии кератиноцитов HaCaT;
- 2) Инактивация p53^{R282Q/H179Y} в клетках HaCaT приводит к значительному изменению их транскриптомного и протеомного профилей;
- 3) p53^{R282Q/H179Y} ассоциирован с высокой пролиферативной активностью клеток HaCaT и является негативным регулятором апоптоза;
- 4) p53^{R282Q/H179Y} сохраняет ряд функций, свойственных белку дикого типа: способность ингибировать процесс эпителиально-мезенхимального перехода и регулировать процесс эпидермальной дифференцировки.

Личный вклад соискателя

Автор лично принимал участие в проведении всех экспериментальных работ, анализе полученных результатов, подготовке публикаций и тезисов конференций.

Степень достоверности результатов

Приведенные данные были получены от трех и более биологических повторов и представлены в виде средних значений со стандартными ошибками среднего (SEM). При обработке результатов были использованы общепринятые методы статистического анализа. Результаты работы были опубликованы в

рецензируемых научных журналах, что позволяет судить о достоверности представленных данных.

Апробация работы

Основные положения диссертации были представлены на российских и международных конференциях и симпозиумах:

- 1) Биотехнология: состояние и перспективы развития (Москва, 2023)
- 2) XXVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2021)
- 3) VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2020)

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 работ в российских и международных научных изданиях. Среди них – 6 статей в рецензируемых научных журналах и 2 публикации в трудах конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, который включает 219 источников. Работа изложена на 113 страницах и содержит 25 рисунков и 3 таблицы

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Нокаут *TP53* в клетках HaCaT

На первом этапе работы с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9 D10A с использованием парных направляющих РНК была получена линия кератиноцитов HaCaT с нокаутом *TP53*. Нокаут был верифицирован методами иммуноблоттинга и секвенирования по Сэнгеру участка предполагаемого редактирования в гене *TP53*. Результаты верификации нокаута *TP53* приведены на рисунке 1.

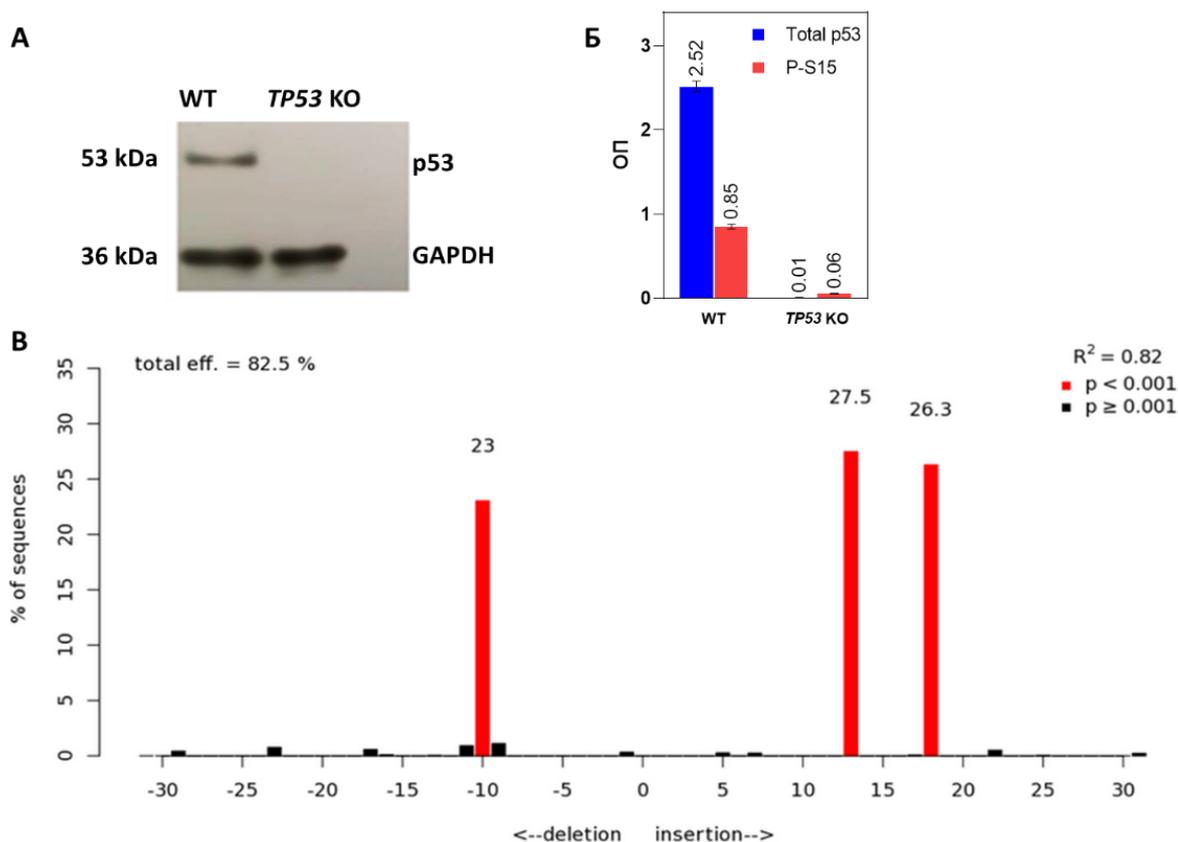


Рисунок 1 – Верификация нокаута *TP53* в клетках HaCaT. (А) Детектирование p53 методом иммуноблоттинга в клетках исходной линии и после проведения редактирования. GAPDH использовали в качестве контроля загрузки (Б) Детектирование тотального и фосфорилированного p53 в клетках HaCaT до и после редактирования. Данные приведены как среднее значение \pm SEM. (В) Анализ последовательности гена *TP53* после редактирования с помощью ПО TIDE

Таким образом, использование системы для редактирования генома CRISPR/Cas9 D10A с парными направляющими РНК является эффективным методом инактивации целевого гена *TP53* в анеуплоидной линии HaCaT.

2. Транскриптомное профилирование клеток WT и *TP53* KO HaCaT

В более раннем исследовании в геноме HaCaT было идентифицировано более 700 тысяч элементов отклика p53. Белок p53 является транскрипционным фактором, поэтому особенный интерес вызывает влияние мутантных форм p53 на экспрессию его подконтрольных генов. С целью изучения влияния нокаута *TP53* было выполнено транскриптомное профилирование клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*. В результате сравнительного транскриптомного анализа всего было идентифицировано 12825 и 12368 генов в клетках WT и *TP53* KO HaCaT, соответственно. Анализ дифференциальной экспрессии выявил 395 генов с измененным уровнем экспрессии в результате нокаута, после чего был выполнен

анализ обогащения по функциональному признаку (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA). Результаты транскриптомного профилирования приведены на рисунке 2.

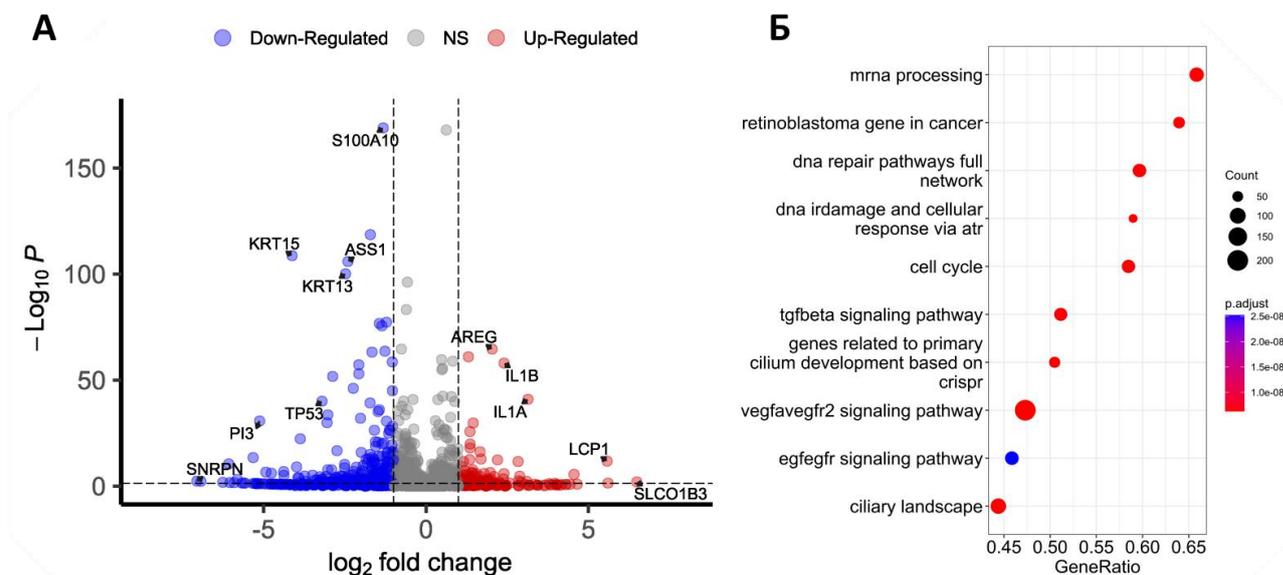


Рисунок 2 – Транскриптомное профилирование клеток WT и *TP53* KO HaCaT. (A) Диаграмма (volcano plot), демонстрирующая гены с дифференциальной экспрессией между линиями (WT и *TP53* KO HaCaT). (Б) – биологические процессы с наибольшим изменением в результате нокаута *TP53*

Согласно результатам GSEA, нокаут *TP53* привел к значительным изменениям в таких путях как процессинг РНК ('mRNA processing'), репарации ДНК ('DNA repair pathways full network' и 'DNA IRdamage'). Также нокаут *TP53* в значительной степени повлиял на путь, ассоциированный с клеточным циклом ('cell cycle'), что соотносится с хорошо изученной ролью p53 в регуляции клеточного цикла. Неожиданным наблюдением стало достоверное изменение экспрессии генов, ассоциированных с формированием первичных ресничек ('genes related to primary cilium development' и 'ciliary landscape'). Эти наблюдения соотносятся с данными недавнего исследования, согласно которым, клетки HaCaT представляют собой удобную модель для исследования формирования и функций первичных ресничек. Кроме того, нарушения в формировании ресничек характерны для случаев атопического дерматита, псориаза и некоторых типов рака кожи.

Биоинформатический анализ транскриптомных данных также выявил сигнальные пути, затронутые в результате нокаута *TP53* (рисунок 3). В клетках с нокаутом *TP53* KO была зарегистрирована активация таких путей как MAPK,

EGFR, NFκB, PI3K и TNFα. Пути PI3K и EGFR являются важными факторами прогрессии многих типов рака, включая базальноклеточную карциному кожи, плоскоклеточную карциному кожи и меланому. Гиперактивация MAPK также вовлечена в такие процессы как опухолевая трансформация и прогрессия опухоли.

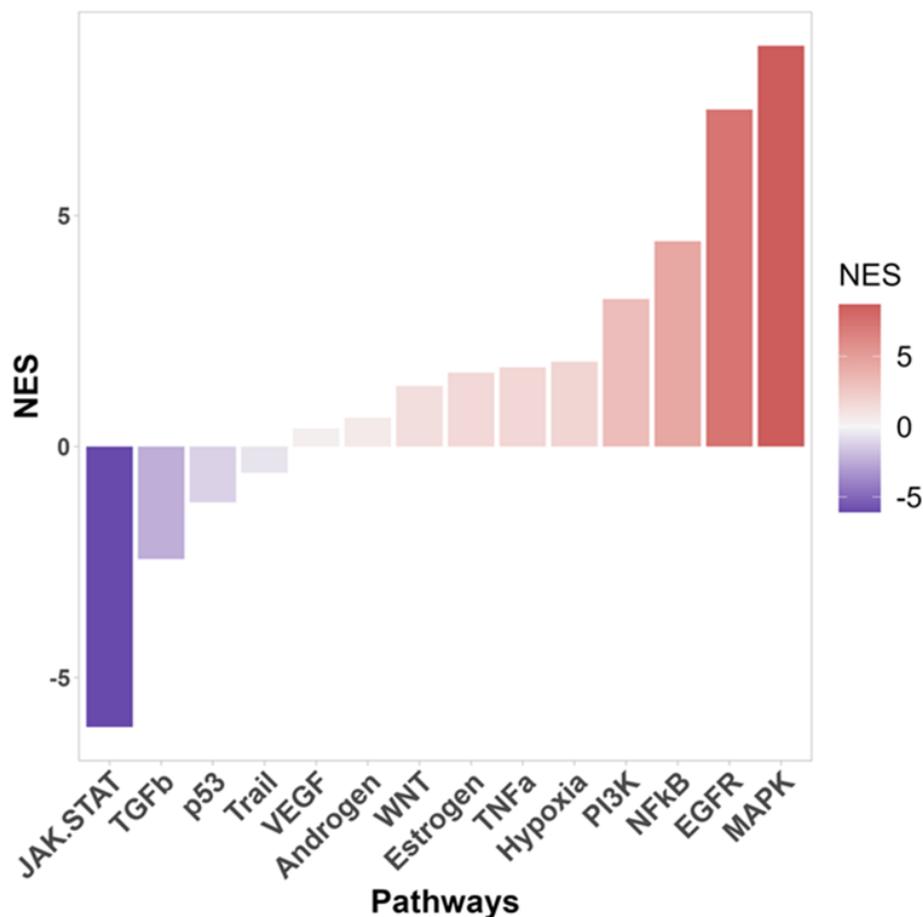


Рисунок 3 – Активность сигнальных путей, включающих гены с дифференциальной экспрессией между линиями WT и *TP53* HaCaT. NES - normalized enrichment score

В результате транскриптомного профилирования было установлено заметное увеличение экспрессии важных медиаторов эпителиально-мезенхимального перехода, таких как *CD274* и *AREG*. Кроме того, в клетках *TP53* KO HaCaT была достоверно увеличена экспрессия генов, ассоциированных с миграцией и инвазией (*DLC-1*, *LPXN*, *MMP13*). В то же время, в клетках *TP53* KO HaCaT была заметно снижена экспрессия *KRT10* и *IVL* - ключевых маркеров эпидермальной дифференцировки.

Длинные некодирующие РНК (lncRNA) играют важнейшую регуляторную роль во многих биологических процессах, включая морфогенез, дифференцировку

и иммунный ответ, апоптоз, пролиферацию, метаболизм, миграцию и другие процессы. Кроме того, недавние исследования демонстрируют, что многие lncRNA играют важную роль в патогенезе рака кожи. Принимая во внимание тот факт, что многие некодирующие РНК входят в регуляторную сеть p53, регулирующая роль мутантного p53 в HaCaT представляет большой интерес. В рамках транскриптомного анализа была проведена оценка нокаута *TP53* на экспрессию длинных некодирующих РНК (lncRNA). В ходе анализа было идентифицировано 10635 и 10282 гена, кодирующих lncRNA, для клеток WT и *TP53* KO HaCaT, соответственно. Анализ дифференциальной экспрессии выявил 118 генов, кодирующих lncRNA, экспрессия которых достоверно различалась в клетках WT и *TP53* KO HaCaT. Из данных литературы следует, что многие из lncRNA, экспрессия которых была повышена в результате нокаута *TP53*, ассоциированы с различными типами рака. Для более детального анализа была выполнена функциональная аннотация списка lncRNA с увеличенной экспрессией с помощью ресурса LNCSEA2.0. Функциональная аннотация транскриптов выявила, что lncRNA с дифференциальной экспрессией (рисунок 4) ассоциированы с такими процессами, как инвазия (cell invasion), миграция (cell migration), прогрессия рака (cancer progression). В рамках анализа аннотацию проводили с использованием репозитория Lnc TarD2, включающего только подтвержденные экспериментально данные (Experimental Validated Function).

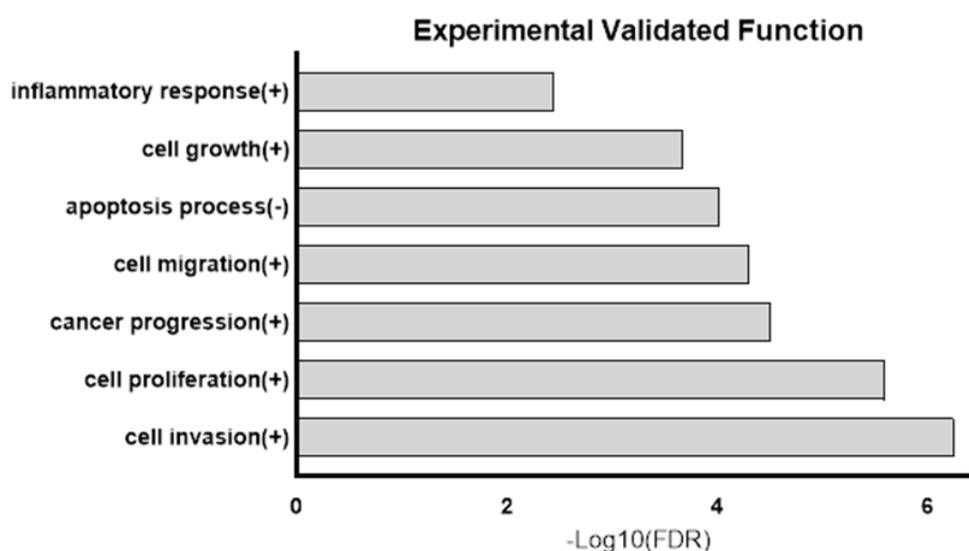


Рисунок 4 – Функциональная аннотация lncRNA с увеличенной в результате нокаута *TP53* экспрессией

Функциональная аннотация транскриптов выявила, что lncRNA с дифференциальной экспрессией (рисунок 11) ассоциированы с такими процессами, как инвазия (cell invasion), миграция (cell migration), прогрессия рака (cancer progression). В рамках анализа аннотацию проводили с использованием репозитория Lnc TarD2, включающего только подтвержденные экспериментально данные (Experimental Validated Function).

Таким образом были выявлены ключевые изменения, ассоциированные с нокаутом *TP53* на уровне транскриптома. К наиболее значимым изменениям можно отнести зарегистрированную активацию сигнальных путей MAPK, PI3K, EGFR, Wnt, а также активацию генов, ассоциированных с миграцией (*LPXN*, *DLC-1*), ЭМП (*AREG*), высокую экспрессию *CD274*, а также ряда lncRNA с выраженными онкогенными свойствами. В то же время, несмотря на наличие мутаций, p53 в HaCaT, по-видимому, сохраняет свою активность в отношении супрессии данных программ.

3. Сравнительный протеомный анализ клеток WT и *TP53* KO HaCaT

Для определения влияния нокаута *TP53* на уровне протеома был выполнен сравнительный панорамный протеомный анализ клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*.

Было идентифицировано 403 белка с дифференциальной экспрессией между линиями (дог₂FC>1, FDR<0,05). Экспрессия 15 белков была снижена в клетках HaCaT в результате нокаута *TP53*, а 388 белков – повышена. С помощью GSEA (рисунок 4) было установлено, что ключевые изменения на протеомном уровне были ассоциированы с такими процессами, как трансляция ('translation', 'cytoplasmic translation'), биосинтезом и метаболизмом белков ('peptide biosynthetic process', 'peptide metabolic process') и другими процессами. На уровне клеточных компонентов основные изменения были связаны с адгезией к субстрату и клеточными адгезией ('cell-substrate junction', 'focal adhesion', 'anchoring junction', 'cell-substrate anchoring junction'). Усиление фокальных контактов ('focal adhesion') вызывало особенный интерес, так как белки фокальных контактов вовлечены в регуляцию миграции и клеточной адгезии мезенхимальных клеток, а увеличение экспрессии данных белков характерно для клеток в процессе ЭМП. Согласно результатам GSEA, к данному термину были относятся 49 белков, среди которых

интегрин- $\alpha 2$ (ITGA2), интегрин- $\alpha 6$ (ITGA6), зиксин (ZYX) и другие. Обогащение белков клеточной адгезии можно расценивать в качестве маркера повышенной миграционной активности. Прогрессия опухоли до агрессивного фенотипа сопровождается изменениями в таких процессах как миграция, инвазия, метаболизм и аутофагия. Клеточный транспорт лежит в основе реализации этих процессов, а Rab-ГТФазы, которые являются важными регуляторами внутриклеточного транспорта за счет скоординированного и динамичного перемещения по внутриклеточным мембранам и цитоскелету. Изменения в экспрессии Rab-ГТФаз связаны с инвазией, миграцией, метаболизмом, аутофагией, секрецией экзосом и лекарственной устойчивостью при раке. Согласно результатам протеомного анализа, нокаут *TP53* приводил к увеличению экспрессии RAB1B ($\log_2FC = 2,04$), RAB5C ($\log_2FC = 1,47$), RAB7A ($\log_2FC = 2,22$), RAB11A ($\log_2FC = 1,72$), RAB14 ($\log_2FC = 1,54$).

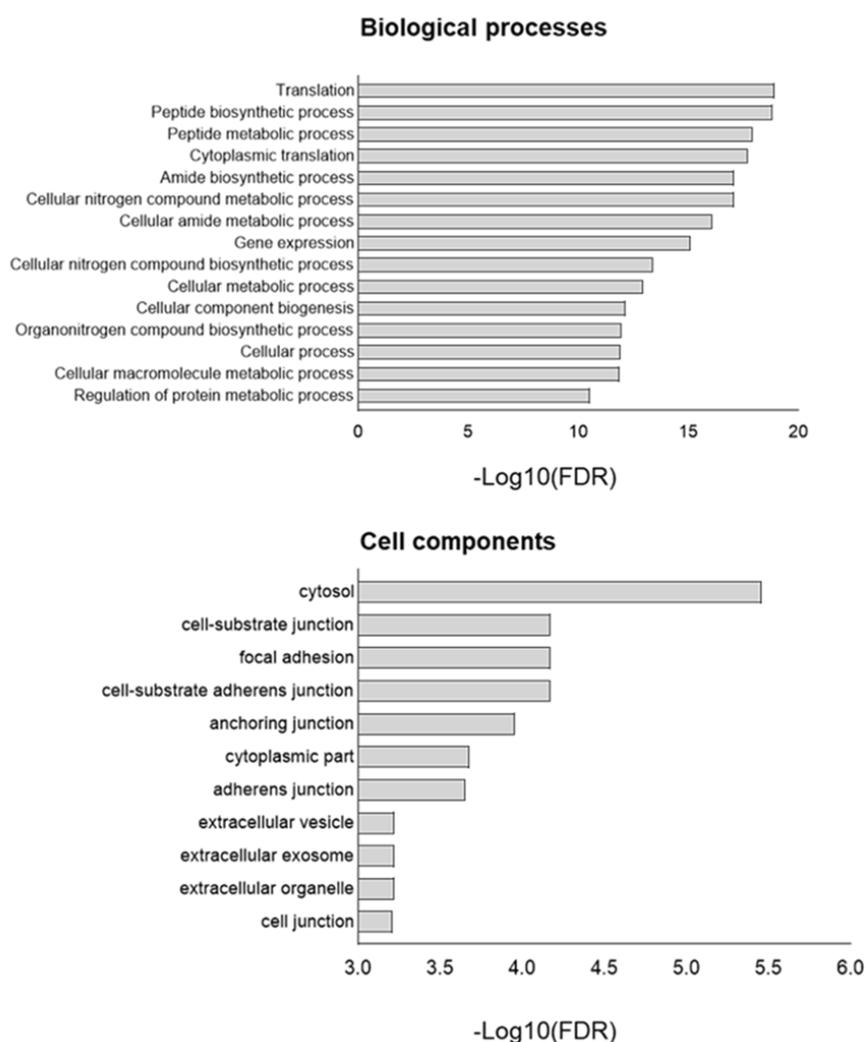


Рисунок 4 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности белков с дифференциальной экспрессией в клетках WT и *TP53* КО HaCaT.

Кроме того, в клетках *TP53* КО HaCaT детектировалось заметное снижение инволюкрина (*IVL*), ключевого маркера эпидермальной дифференцировки. Аналогичный результат был зарегистрирован в ходе транскриптомного анализа.

Таким образом, среди физиологических характеристик полученной линии, оценка скорости миграции и экспрессии маркеров эпидермальной дифференцировки представляли наибольший интерес.

4. Нокаут *TP53* приводит к снижению скорости пролиферации в клетках HaCaT

В более ранних исследованиях было показано, что мутантный p53 ассоциирован с повышенной скоростью пролиферации в клетках HaCaT, так как нокаунт *TP53* приводил к снижению пролиферативной активности. В рамках настоящего исследования было оценено влияние нокаута *TP53* на скорость пролиферации клеток HaCaT путем анализа скорости разбавления флуоресцентной метки CytotracerTM Red (рисунок 5А), а также с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (рисунок 5Б, В). Снижение интенсивности флуоресценции (разбавление метки) пропорционально количеству клеточных делений. Согласно полученным данным, скорость пролиферации клеток *TP53* КО HaCaT была заметно снижена по сравнению с клетками дикого типа, что хорошо соотносится с данными литературы и подтверждает, что мутантный p53 действительно ассоциирован с повышенной скоростью пролиферации.

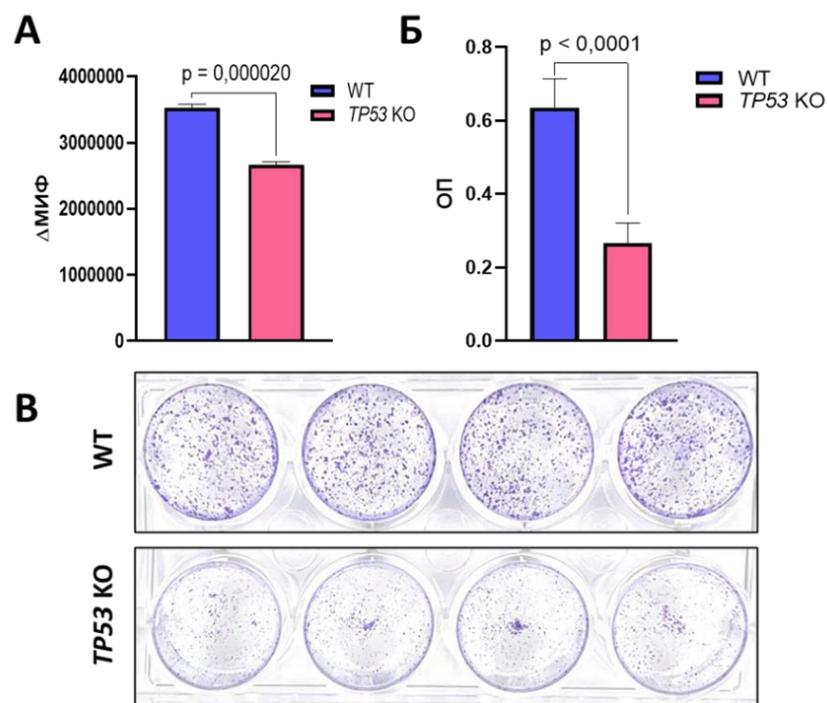


Рисунок 5 – Влияние нокаута *TP53* на скорость пролиферации клеток HaCaT (А) Определение скорости пролиферации путем анализа скорости разбавления флуоресцентной метки Cytotrace™ Red. Δ МИФ – дельта медиан интенсивности флуоресценции между контрольными (0 часов после внесения метки) и активно пролиферирующими клетками (48 часов после внесения метки). Данные приведены как среднее значение Δ МИФ \pm SEM (Б) определение скорости пролиферации с помощью кристаллического фиолетового спустя 48 часов после засева клеток. Данные приведены как среднее значение ОП \pm SEM (В) Фотографии культур WT и *TP53* KO HaCaT, окрашенных кристаллическим фиолетовым

5. Нокаут *TP53* приводит к активации апоптоза в клетках HaCaT

Наряду с контролем клеточного цикла, регуляция программируемой клеточной гибели также является ключевой функцией p53. Мутации в *TP53*, в результате которых p53 теряет способность к индукции апоптоза, могут существенно влиять на прогрессию опухоли. В то же время, влияние мутаций в *TP53* в клетках HaCaT на регуляцию апоптоза остается малоизученным. Кроме того, в литературе встречаются противоречивые данные об участии p53 при индукции UVB-индуцированного апоптоза в клетках HaCaT. Так, в своей работе Martynova et al. демонстрируют, что нокадаун p53 приводит к снижению уровня апоптоза в клетках HaCaT после воздействия UVB. В другом исследовании были опубликованы противоположные данные. Авторы, которые продемонстрировали, что мутантный p53 в HaCaT кооперирует с NF- κ B и индуцирует IL-1/TNF-опосредованный апоптоз. Авторы находят изящное объяснение данному явлению:

кожа подвергается хроническому воздействию UVB, который также индуцирует секрецию IL-1. В таких условиях значительное количество hotspot-мутаций (до 4% в эпидермисе) может выполнять защитную функцию посредством индукции апоптоза и элиминации предраковых клеток. В то же время, другие исследования связывают мутантный p53 в HaCaT с более высокой устойчивостью клеток при химической индукции апоптоза такими соединениями как PhIP и камптотецин.

С целью оценки влияния нокаута *TP53* на чувствительность клеток HaCaT к апоптозу оценивали уровни апоптоза в клетках WT и *TP53* KO HaCaT при воздействии карбонилцианид м-хлорфенилгидразона (СССР). Воздействие СССР напрямую воздействует на митохондрии и приводит к индукции апоптоза. Детектирование апоптоза (рисунок 6) осуществляли с помощью окрашивания annexin V и PI спустя 24 часа экспозиции с СССР (30 и 50 нМ). Согласно полученным данным, СССР приводил к индукции апоптоза в обеих линиях, однако, число клеток в состоянии апоптоза было заметно выше в клетках с нокаутом *TP53*. Кроме того, в клетках *TP53* KO HaCaT апоптоз детектировался в значительной доле клеток при более низкой концентрации СССР. Так, при воздействии 30 нМ СССР в клетках дикого типа лишь $3,07 \pm 0,24\%$ находились в состоянии раннего апоптоза, в то время как в клетках с нокаутом детектировалось $16,06 \pm 1,10\%$ клеток в состоянии апоптоза. При увеличении концентрации до 50 нМ, число клеток дикого типа в состоянии апоптоза (Q3-2 + Q3-4) составляло $34,64 \pm 2,75\%$, в то время как в клетках *TP53* KO HaCaT этот показатель составлял $47,14 \pm 1,47\%$.

Согласно полученным данным, нокаут *TP53* приводит к сенсбилизации клеток HaCaT к индукции апоптоза СССР.

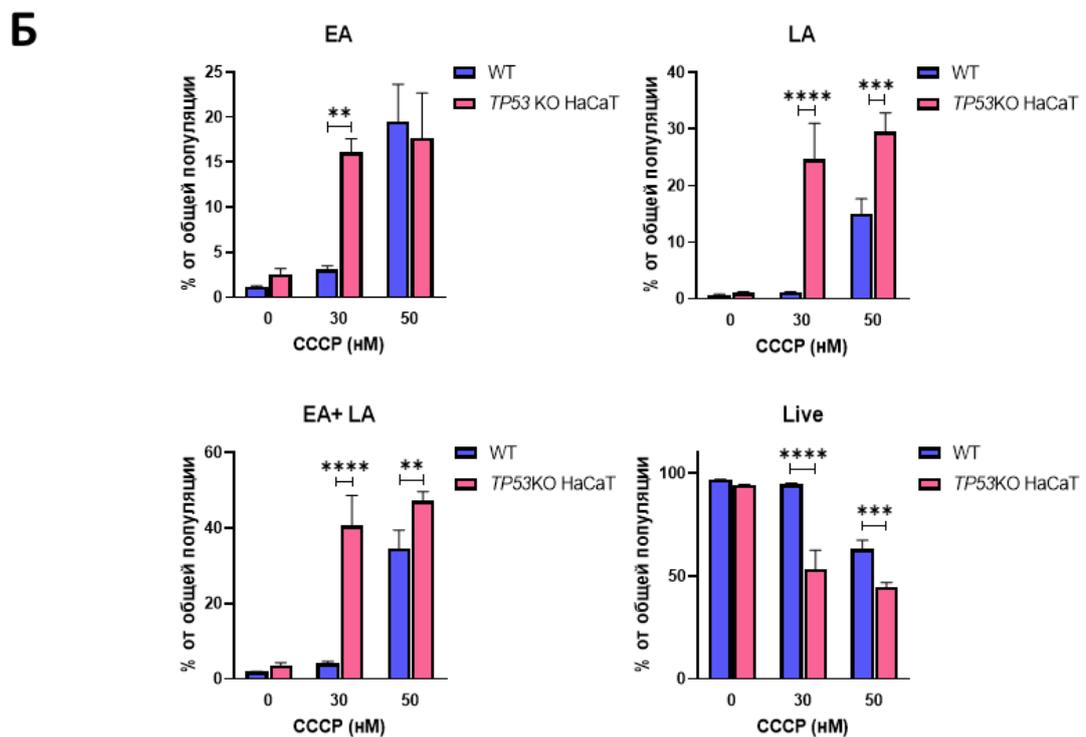
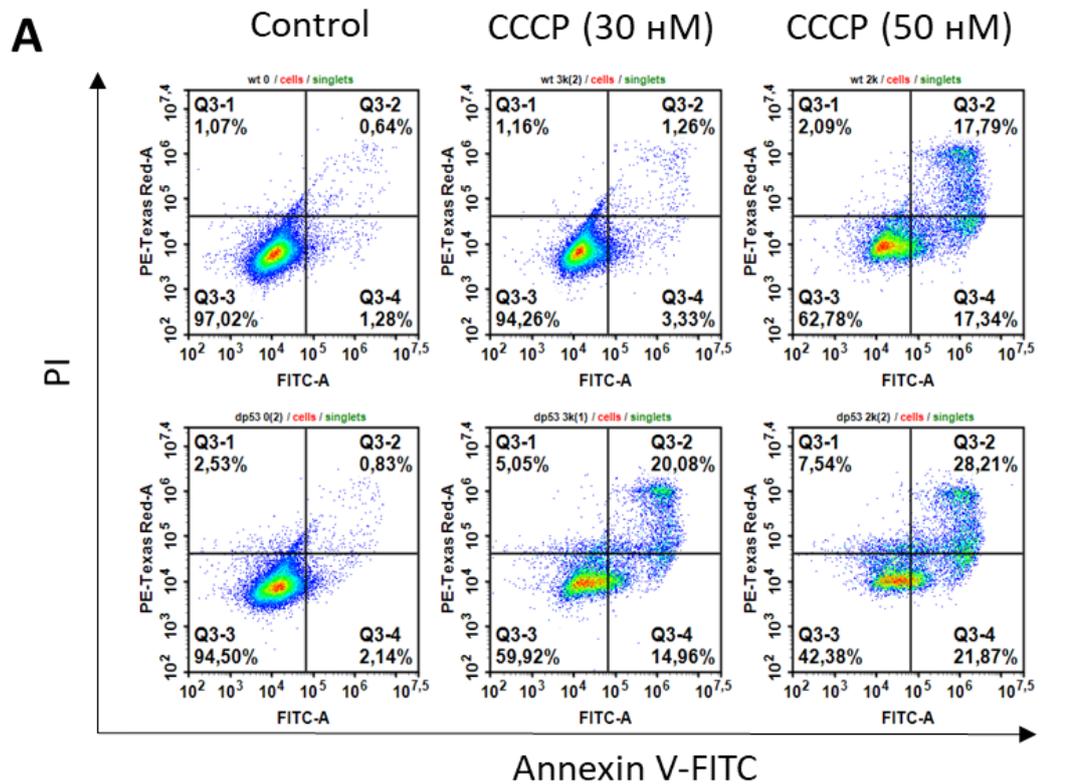


Рисунок 6 – Детектирование апоптоза в клетках WT и *TP53 KO* HaCaT при воздействии CCCP (А) Окрашивание annexin V/PI. Репрезентативные изображения, полученные с помощью проточной цитометрии (Б) Результаты проточной цитометрии. EA – ранний апоптоз, LA – поздний апоптоз, Live – жизнеспособные клетки. Данные приведены как среднее значение \pm SEM. ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

6. Нокаут *TP53* приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки

Участие белка p53 в регуляции эпидермальной дифференцировки изучено недостаточно. В то же время, мы наблюдали значительное снижение уровня инволюкрина на уровне белка и мРНК, поэтому мы провели оценку экспрессии ключевых маркеров дифференцировки при индукции данной программы. Эпидермальную дифференцировку индуцировали путем продолжительного (9 суток) культивирования в среде с повышенной (2,8 мМ) концентрацией кальция, как было предложено в работе. Анализ экспрессии мРНК (рисунок 7А) при индукции дифференцировки выявил, что экспрессия данных генов индуцируется лишь в клетках дикого типа, но не в нокаутных клетках, в которых данная программа либо подавлена полностью, либо индуцируется с задержкой и в значительно меньшей степени (*IVL*).

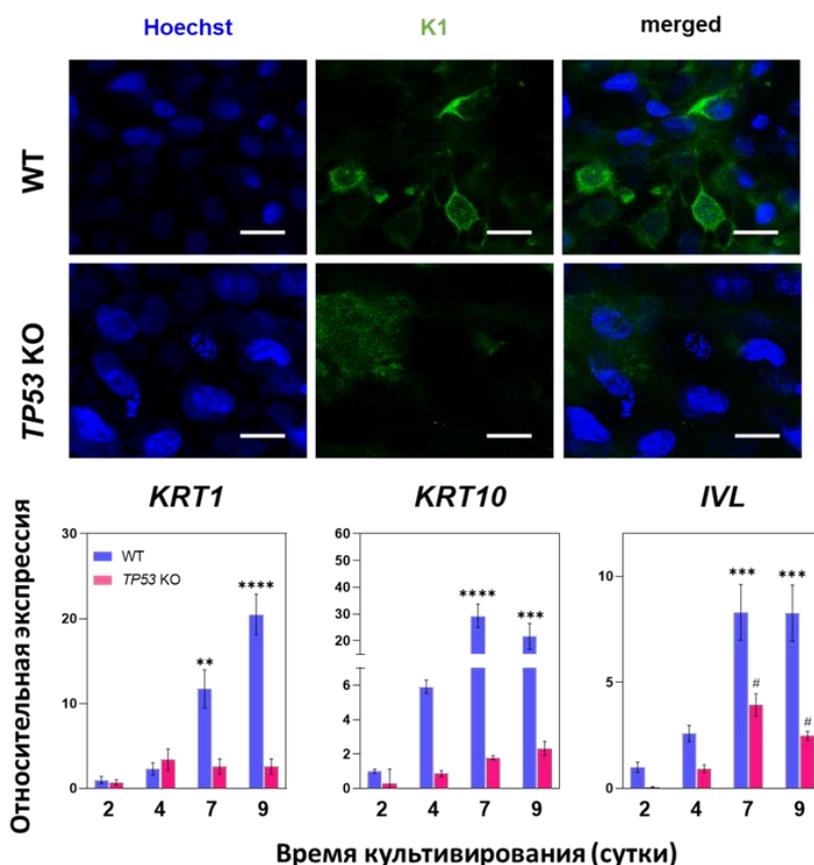


Рисунок 7 – Нокаут *TP53* приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки в клетках NaCaT. (А) ИЦХ: окрашивание кератина 1 (K1) в эпидермальных эквивалентах, полученных на основе клеток WT и *TP53* KO NaCaT путем продолжительного (14 суток) культивирования на границе раздела фаз жидкость-воздух при повышенной концентрации кальция (Б) Определение уровня *KRT1*, *KRT10*, *IVL* (маркеров продвинутых стадий эпидермальной

дифференцировки) методом ОТ-ПЦР-РВ (индукция дифференцировки путем продолжительного культивирования клеток при повышенной концентрации кальция (2,8 мМ). **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$. Данные приведены как среднее значение \pm SEM.

Культивирование на границе раздела фаз жидкость-воздух является распространенным способом для получения трехмерных эпидермальных эквивалентов на основе кератиноцитов человека. В таких условиях нормальные кератиноциты образуют роговой слой, Клетки HaCaT обычно не образуют полноценный стратифицированный эпидермис, а лишь несколько неравномерных слоев клеток с атипичной экспрессией маркеров дифференцировки, часто не ассоциированной с конкретным слоем 3D модели. При культивировании на границе раздела фаз экспрессия кератина 1 (рисунок 7Б) была значительно ниже в клетках *TP53* KO HaCaT по сравнению с клетками дикого типа, что хорошо соотносится с результатами ОТ-ПЦР-РВ и также подтверждает, что нокаут *TP53* приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки.

Полученные нами результаты соотносятся с данными более ранних исследований, которые подтвердили, что p53 участвует в регуляции дифференцировки в клетках HaCaT. Вероятно, не смотря на наличие мутаций, p53 сохраняет функциональную активность, необходимую для реализации программы эпидермальной дифференцировки.

7. Нокаут *TP53* приводит к увеличению скорости миграции клеток HaCaT

Анализ данных протеомного и транскриптомного анализа выявил изменения, которые могли бы быть связаны с повышенной скоростью миграции в клетках *TP53* KO HaCaT. В частности, этому свидетельствовало увеличение экспрессии генов, ассоциированных с миграцией, таких как *LPXN*, *DLC-1*, *CD274* и др. На уровне протеома наблюдалось обогащение белков, ассоциированных с такими процессами, как адгезия к субстрату, фокальная адгезия и др., что также могло привести к увеличению скорости миграции.

Для проверки данной гипотезы скорость миграции в клетках WT и *TP53* KO HaCaT оценивали с помощью скретч-теста (scratch-wound assay). Согласно полученным результатам, клетки с нокаутом *TP53* заполняли повреждение быстрее, чем клетки дикого типа (рисунок 8А,Б). С целью полного исключения влияния пролиферации, скорость миграции оценивали в том числе в условиях

предварительной обработки клеток митомицином С. Согласно полученным данным, скорость заполнения повреждения клетками *TP53* КО HaCaT была значительно выше по сравнению с клетками дикого типа как в условиях обработки митомицином С, так и без нее.

В недавнем исследовании была исследована роль длинной некодирующей РНК PRECSIT (p53 regulated carcinoma-associated STAT3-activating long intergenic non-protein coding transcript) в поддержании инвазии клеток плоскоклеточной карциномы кожи (cSCC). PRECSIT вовлекает STAT3 для регуляции экспрессии MMP-1 и MMP-13, которые, в свою очередь, способствуют инвазии клеток. Так как транскриптомный анализ выявил заметное увеличение уровня *MMP-13* в клетках с инактивированным *TP53*, мы предположили, что уровень PRECSIT может быть увеличен в клетках *TP53* КО HaCaT. Определение уровня экспрессии *PRECSIT* (рисунок 8В) выявило заметное увеличение экспрессии PRECSIT в клетках *TP53* КО HaCaT, что хорошо соотносится с данными литературы. Вероятно, нокаут *TP53* снимает репрессирующее действие p53 в отношении PRECSIT, что приводит к увеличению экспрессии данной lncRNA и усилению миграционной активности клеток HaCaT. Полученные результаты подтверждают данные транскриптомного анализа и свидетельствуют о том, что нокаут *TP53* усиливает миграционную активность клеток HaCaT.

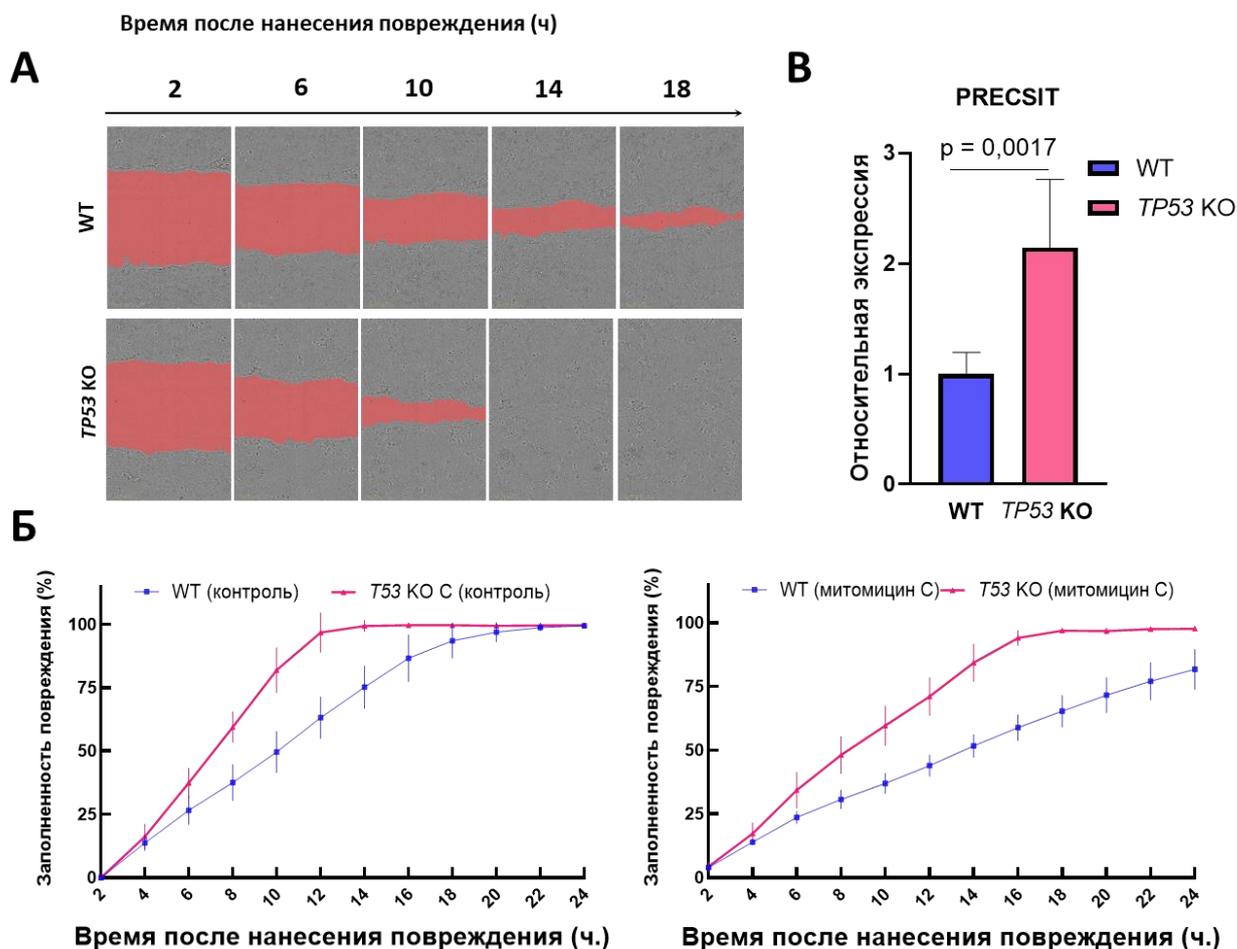


Рисунок 8 – Влияние нокаута *TP53* на скорость миграции в клетках HaCaT. (А) Scratch-test: изображения, полученные при обработке микрофотографий репрезентативного технического повтора. (Б) Определение скорости заполнения дефекта, моделирующего повреждение эпидермиса, клетками WT и *TP53 KO* HaCaT. (В) Определение относительной экспрессии PRECSIT в клетках WT и *TP53 KO* HaCaT. Данные приведены как среднее значение \pm SEM.

8. Нокаут *TP53* приводит к проявлению признаков эпителиально-мезенхимального перехода и реализации про-онкогенных программ в клетках HaCaT

Согласно результатам молекулярного профилирования и функциональной характеристики, клетки *TP53 KO* HaCaT демонстрируют определенные признаки эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Для подтверждения данной гипотезы была выполнена оценка уровня экспрессии ЭМП-сигнатурных генов (general EMT score) (рисунок 9А). Согласно полученным данным, нокаут *TP53* приводил к смещению транскриптомного профиля клеток HaCaT в сторону мезенхимального фенотипа. Вероятно, помимо значимых регуляторов ЭМП

(*AREG*, *CD274*), вклад в общее значение показателя EMT-score вносят гены, ассоциированные с миграцией и подвижностью клеток (*DLC-1*, *LPXN*), и другие гены с высоким диапазоном изменения. Результаты биоинформатического анализа были верифицированы путем оценки экспрессии ключевых маркеров ЭМП – CD324 и CD325 (Е-кадгерин и N-кадгерин, соответственно) методом проточной цитометрии (рисунок 9Б).

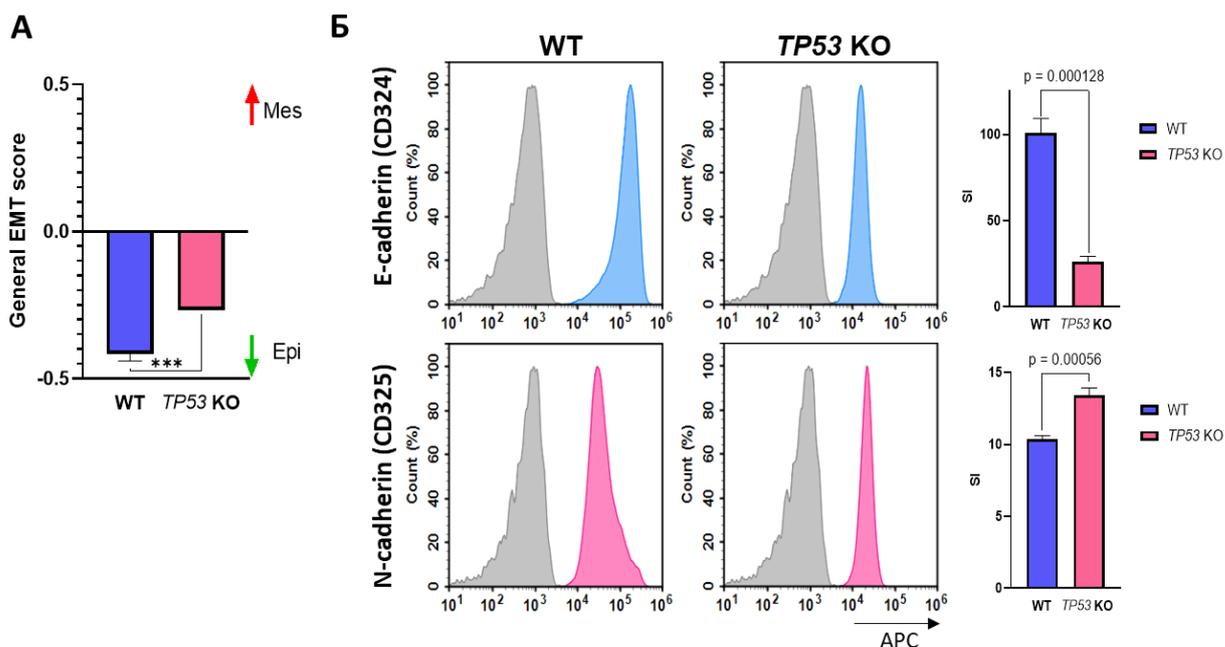


Рисунок 9 – Нокаут *TP53* приводит к проявлению признаков ЭМП в клетках HaCaT (А) – определение EMT-score (-1 = полностью эпителиальный фенотип, +1 = полностью мезенхимальный фенотип). Данные приведены как среднее значение \pm SEM. *** $p = 0,00001$ (Б) Определение экспрессии Е- и N-кадгеринов в клетках WT и *TP53* KO HaCaT методом проточной цитометрии. SI – stain index. Данные приведены как среднее значение \pm SEM.

Транскриптомное профилирование также выявило увеличение экспрессии *CD274* (PD-L1) в клетках *TP53* KO HaCaT, что вызвало особенный интерес в контексте реализации программы ЭМП и про-онкогенных свойств. Результаты транскриптомного анализа были верифицированы методом проточной цитометрии (рисунок 10). Окрашивание PD-L1 выявило значительно увеличение (более чем в 5 раз) уровня PD-L1 на поверхности клеток *TP53* KO по сравнению с клетками дикого типа.

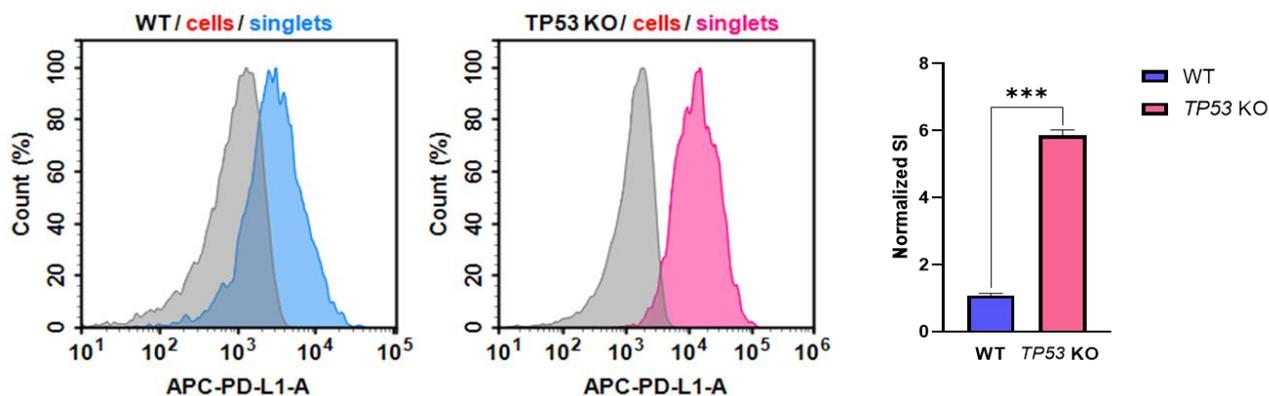


Рисунок 10 – Определение PD-L1 в клетках NaCaT и *TP53* KO NaCaT методом проточной цитометрии. SI – stain index. *** $p = 0,00002$. Данные приведены как среднее значение \pm SEM.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Белок p53 является супрессором опухоли, а мутации в *TP53* встречаются в более чем 50% случаев рака. Мутации в *TP53* являются наиболее ранними генетическими изменениями в клетках кожи, подтвержденных воздействием ультрафиолетового излучения, что может приводить к опухолевой трансформации и прогрессии опухоли. УФ-индуцированные мутации в ДНК-связывающем домене p53 чрезвычайно распространены в случаях карциномы кожи. Иммуортиализованные кератиноциты линии NaCaT несут аналогичные мутации (R282Q и H179Y), однако, свойства мутантного p53^{R282Q/H179Y} не изучены в полной мере.

В настоящей работе впервые была получена линия кератиноцитов NaCaT с нокаутом *TP53*. С целью исследования особенностей p53^{R282Q/H179Y} было выполнено молекулярное профилирование клеток NaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*. Ключевые изменения, выявленные в результате транскриптомно-протеомного анализа, включали активацию экспрессии генов, ассоциированных с миграцией, инвазией, трансляцией, клеточной адгезией и регуляцией эпителиально-мезенхимального перехода, а также активацию сигнальных путей MAPK, EGFR, PI3K, Wnt и др. Также в клетках с нокаутом *TP53* отмечалось обогащение белков фокальной адгезии и ГТФаз семейства Rab. Кроме того, в рамках настоящего исследования впервые проведена оценка дифференциальной экспрессии длинных некодирующих РНК в клетках NaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*.

Согласно полученным данным, p53^{R282Q/H179Y} ассоциирован с высокой пролиферативной активностью и ингибирует апоптоз, что, вероятно, связано с

приобретением неканонических функций p53. Вместе с тем, p53^{R282Q/H179Y} в клетках HaCaT сохраняет онкосупрессорную активность, в частности, регулирующую роль в процессах, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, а также участвует в регуляции эпидермальной дифференцировки.

ВЫВОДЫ

- 1) Система CRISPR/Cas9^{D10A} с использованием парных направляющих РНК эффективна для получения нокаута *TP53* в анеуплоидной клеточной линии кератиноцитов HaCaT;
- 2) Инактивация p53^{R282Q/H179Y} приводит к значительным изменениям экспрессии ряда белков на транскриптомном и протеомном уровнях. Наиболее выраженные изменения наблюдаются для генов и белков, вовлеченных в процессы метаболизма, биосинтеза, миграции, адгезии и эпидермальной дифференцировки;
- 3) p53^{R282Q/H179Y} ассоциирован с высокой пролиферативной активностью и ингибирует Cd²⁺ и СССР-индуцированный апоптоз в клетках HaCaT;
- 4) p53^{R282Q/H179Y} сохраняет онкосупрессорную активность и регулирующую роль в процессе эпидермальной дифференцировки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021 - 2030 годы) (№ 122022800481-0).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. **Romashin, D.**, Rusanov, A., Arzumian, V., Varshaver, A., Poverennaya, E., Vakhrushev, I., Netrusov A.I., Luzgina, N. //Current Issues in Molecular Biology. – 2024. – Т. 46. (№. 2). – С. 1451-1466.
2. **Romashin, D.**, Rusanov, A., Tolstova, T., Varshaver, A., Netrusov, A., Kozhin, P., Luzgina, N. Loss of mutant p53 in HaCaT keratinocytes promotes cadmium-induced keratin 17 expression and cell death //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – Т. 709. – С. 149834.

3. Кожин, П. М., **Ромашин, Д. Д.**, Русанов, А. Л., Лузгина, Н. Г. Нокаут мутантного TP53 в клетках линии HaCaT усиливает их миграционную активность // Вестник РГМУ. - 2022. - №6. - С. 48–54. DOI: 10.24075/vrgmu.2022.070.
4. Rusanov, A. L., **Romashin, D. D.**, Kozhin, P. M., Karagyaur, M. N., Loginov, D. S., Tikhonova, O. V., Zgoda V.G., Luzgina, N. G. Impact of p53 knockout on protein data set of HaCaT cells in confluent and subconfluent conditions //Data. – 2022. – Т. 7. (№. 3). – С. 27.
5. Rusanov, A. L., **Romashin, D. D.**, Zgoda, V. G., Butkova, T. V., Luzgina, N. G. Protein dataset of immortalized keratinocyte HaCaT cells and normal human keratinocytes //Data in Brief. – 2021. – Т. 35. – С. 106871.
6. 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). - С. 60–67. DOI: 10.24075/vrgmu.2020.082.

Работы, опубликованные в сборниках материалов научных конференций:

7. **Ромашин Д.Д.**, Кожин П.М., Костенко Ю.Б., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г. Нокаут TP53 приводит к увеличению скорости миграции и индукции экспрессии ламинина-5 в кератиноцитах HaCaT // Биотехнология: состояние и перспективы развития. Сборник тезисов конференции, Москва. – 2023. – С. 95-96.
8. **Ромашин Д.Д.**, Карагяур М.Н., Лузгина Н.Г., Русанов А.Л. Получение клеточной модели на основе нормальных кератиноцитов человека линии HaCaT с нокаутом гена TP53 // VII Молодёжная школа-конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН, Гены и клетки, Москва.. – 2020. – С. 111-112.