ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н. ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

РОМАШИН ДАНИИЛ ДМИТРИЕВИЧ

ФУНКЦИИ МУТАНТНОГО Р53 В КЕРАТИНОЦИТАХ НАСАТ

1.5.4. – «Биохимия»

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.х.н.

Русанов А.Л.

оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Строение и функции эпидермиса	11
1.2 Эпидермальная дифференцировка	12
1.3 Получение и генетические особенности линии НаСаТ	16
1.4 Сравнение клеток линии НаСаТ и нормальных кератиноцитов	21
1.5. Биология гена ТР53	23
1.5.1 Регуляция р53	27
1.5.2 Структура гена ТР53 и его изоформ	28
1.5.3 Гомологи р53	30
1.6 Мутации в ТР53 и их роль в прогрессии рака кожи	33
1.7 Некодирующие РНК в регуляторной сети р53	36
1.8 Эпителиально-мезенхимальный переход и опухолевая трансформация в клетках НаСат	27
	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Объект исследования	40
2.2 Получение клеточной линии с нокаутом гена ТР53	40
2.3 Анализ скорости пролиферации	42
2.4 Детектирование апоптоза	42
2.5 Проточная цитометрия	43
2.6 Иммуноблоттинг	43
2.7 Транскриптомное профилирование	44
2.8 Анализ протеома клеточных линий	45
2.9 Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени	47

2.10 Послойное культивирование 48
2.11 МТТ-тест
2.12 Оценка скорости миграции (Scratch-wound assay) 49
2.14 Восстановление экспрессии р53 дикого типа в клетках ТР53 КО НаСаТ 51
2.15 Статистическая обработка данных 53
ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 54
3.1 Нокаут <i>ТР53</i> в клетках НаСаТ 54
 3.2 Молекулярное профилирование клеток HaCaT и <i>TP53</i> KO HaCaT
 3.3 Нокаут <i>ТР53</i> в клетках НаСаТ приводит к реализации про-онкогенных программ 70 3.3.1 Клетки НаСаТ, дефицитные по р53, проявляют признаки ЭМП
3.4 р53 ^{R282Q/H179Y} ассоциирован с повышенной пролиферативной активностью
3.5 Нокаут ТР53 приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки 78
3.5 Нокаут ТР53 усиливает индукцию апоптоза в клетках НаСаТ
3.6 Мутантный р53 ^{R282Q/H179Y} репрессирует экспрессию кератина 17 86
3.7 Восстановление экспрессии р53 дикого типа в клетках <i>ТР53</i> КО НаСаТ
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ВЫВОДЫ
БЛАГОДАРНОСТИ
ФИНАНСИРОВАНИЕ
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 96

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- БСА бычий сывороточный альбумин
- ВКМ внеклеточный матрикс
- ДМСО диметилсульфоксид
- ДНК дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДСН додецилсульфат натрия
- ИФА иммуноферментный анализ
- МТТ тетразолиевый краситель (тиазолил синий тетразолий бромид)
- ОТ обратная транскрипция
- ПЖК подкожная жировая клетчатка
- ПЦР полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РНК рибонуклеиновая кислота
- ЭМП эпителиально-мезенхимальный переход
- ANOVA, analysis of variance (англ.) однофакторный дисперсионный анализ
- BPE, bovine petuitary extract (англ.) экстрат бычьего гипофиза
- СССР, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (*англ*.)- карбонилцианид мхлорфенилгидразон
- CRISPR clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats
- DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMEM/F12 Dulbecco's modified Eagle medium: nutrient mixture F-12
- DPBS Dulbecco's modified phosphate buffer saline
- **DTT** дитиотреитол
- FDR, false discovery rate (англ.) –ожидаемая доля ложных отклонений
- GFP, green fluorescent protein (*англ.*) зелёный флуоресцентный белок
- GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (англ.) –
- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- GO, gene ontology (англ.) генная онтология
- GOF gain-of-function (англ.) приобретение функции

GSEA – gene set enrichment analysis (*англ*.) – анализ обогащения по функциональной принадлежности

IL – интерлейкин

INFү – интерферон гамма

KGF, keratinocyte growth factor (англ.) – фактор роста кератиноцитов

КО – нокаут

LncRNA, long non-coding RNA (англ.) – длинные некодирующие РНК

MMLV, mouse Moloney leukemia virus (англ.) – вирус лейкоза мышей

NHK, normal human keratinocytes – нормальные кератиноциты человека

OECD, organisation for economic co-operation and development (англ.) -

рганизация экономического сотрудничества и развития

PBS – фосфатно-солевой буфер

PEI – полиэтиленимин

PI, propidium iodide (англ.) – пропидий йодид

SCC, squamous cell carcinoma (англ.) – плоскоклеточная карцинома

TGF- β 1, transforming growth factor beta 1 (*англ*.) - трансформирующий фактор роста бета 1

TNF, tumor necrosis factor (англ.) – фактор некроза опухоли

UV – ультрафиолетовое излучение

UVВ - средневолновой ультрафиолет (280-315 нм)

WT, wild type (англ.) – дикий тип

введение

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 [1, 2].

Мутации в *TP53* встречаются в более чем 50% злокачественных опухолей. Превалирующими мутациями в *TP53* являются миссенс-мутации в ДНКсвязывающем домене (ДСД), в особенности – в кодонах R175, R213, G245, R248, R273 и R282 [3]. Разные варианты мутаций гена приводят с различной степени угнетения/изменения функций кодируемого белка. Так, p53^{R175C} сохраняет все свойства белка дикого типа [4], p53^{R175P} активен в отношении регуляции клеточного цикла, но не способен индуцировать апоптоз в клетках аденокарциномы легкого H1299 [5, 6], а p53^{R175H} полностью утрачивает каноничные функции и приводит к прогрессии рака поджелудочной железы [6– 8].

Кожа подвергается УФ-излучению, которое человека оказывает существенное генотоксическое действие. Если повреждения ДНК не устраняются механизмами репарации, УФ-излучение может приводить к «УФ-сигнатурных мутаций» в TP53 (С \rightarrow T и СС \rightarrow TT появлению В дипиримидиновых участках) [9]. Подобные мутации обнаруживаются В случаев плоскоклеточной карциномы кожи (54-90%) большинстве И способствуют прогрессии опухоли [10, 11]. УФ-индуцированные мутации в ТР53 являются ранними генетическими изменениями в процессе канцерогенеза и приводят к потере каноничных функций р53. 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* [12].

Клетки HaCaT _ спонтанно-иммортализованные неопухолевые кератиноциты человека. Данная НаСаТ 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 кератиноцитов, маркеры эпидермальной нормальных экспрессируют дифференцировки в ответ на стимулы [13] и в определенных условиях способны к формированию стратифицирующего слоя *in vivo* [14]. При этом, клетки данной линии несут независимые УФ-сигнатурные мутации в обеих аллелях ТР53 (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 ТР53 в НаСаТ ранее было установлено, что мутантный p53 в HaCaT функционален в отношении контроля клеточного цикла индукции апоптоза, но обладает атипичной И транскрипционной активностью, что приводит к усилению пролиферации клеток [15]. При этом, авторы не исследовали активность р53^{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 р53^{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*;
- Выполнить молекулярное профилирование полученной линии с использованием методов транскриптомного и протеомного анализа;
- Исследовать способность мутантного p53^{R282Q/H179Y} к регуляции пролиферативной активности, апоптоза и дифференцировки в кератиноцитах HaCaT;
- 4) Охарактеризовать участие мутантного р53^{R282Q/H179Y} в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода.

Научная новизна работы

Впервые была получена новая линия кератиноцитов НаСаТ со стабильным Впервые было нокаутом *TP53*. выполнено комплексное исследование особенностей протеома и транскриптома клеток НаСаТ 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 р53^{R282Q/H179Y} приводит к увеличению генов, ассоциированных с миграцией и инвазией (LPXN, DLC-1, *MMP13*. *LCP-1*). репрессии ключевых маркеров эпидермальной (IVL, KRT1, дифференцировки *KRT10*), активации эпителиальномезенхимального перехода и увеличению экспрессии CD274 (PD-L1). Было показано, что инактивация р53^{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 ТР53 может быть использована в дальнейших исследованиях функциональных особенностей р53^{R282Q/H179Y}. С использованием методов транскриптомного и протеомного анализа, а также функциональных тестов, получены новые сведения о функциональных особенностях мутантного р53^{R282Q/H179Y}. Установлено, что несмотря на наличие мутаций, р53^{R282Q/H179Y} сохраняет онкосупрессорную активность в отношении репрессии эпителиально-мезенхимального перехода, а регуляторную также выполняет роль В процессе эпидермальной дифференцировки. Полученные сведение могут иметь значение для понимания роли отдельных мутаций ТР53 в процессе канцерогенеза. В связи с тем, что мутации R282Q/H179Y в TP53 часто встречаются при раке кожи, новые сведения о функциональных особенностях р53^{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*.

9

Основные положения, выносимые на защиту

- 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 НаСаТ 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.

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.

Личный вклад соискателя

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение и функции эпидермиса

Кожа человека выполняет множество функций, включая защиту от внешних факторов различной природы, терморегуляцию, защиту OT дегидратации и патогенов. Также, является периферическим органом иммунной системы. Кожа состоит из трех слоев: подкожной жировой клетчатки (ПЖК), дермы и эпидермиса [16]. ПЖК главным образом состоит из жировой и рыхлой соединительной тканей и выполняет функции поддержания гомеостаза, депонирования энергии, механической защиты [17]. Дерма находится над жировой клетчаткой и представлена соединительной тканью. Дерма выполняет структурную функцию за счет секреции коллагена и других матриксных белков (фибронектина, эластина, гликанов) фибробластами [18]. Структуру эпидермиса формируют кератиноциты, которые находятся в непосредственном контакте с окружающей средой. В процессе развития эпидермальные клетки кожи быстро дифференцируются и образуют четыре слоя: роговой, зернистый, шиповатый и базальный слой [19]. Процесс эпидермальной дифференцировки кератиноцитов обеспечивает непрерывное обновление рогового слоя и всего эпидермиса в целом, что позволяет адаптировать биологическую активность эпидермиса в зависимости от условий окружающей среды [19]. Дефекты кожного барьера вносят вклад в этиологию широкого спектра заболеваний, включая атопический дерматит, аллергический и контактный дерматит, инфицирование патогенными микроорганизмами.

Вне зависимости от особенностей этиопатогенеза, одним из основных заболеваний являются области морфологических проявлений этих способностью гиперпролиферирующих кератиноцитов сниженной co К дифференцировке. Генетически-обусловленные нарушения процессов кератинизации характерны также для ряда тяжелых наследственных заболеваний кожи, сложно поддающихся терапии. Исследование молекулярно-генетических механизмов нарушения процесса дифференцировки клеток эпителиальных тканей и разработка основанных на полученных данных актуальных клеточных моделей является актуальной задачей для разработки новых лекарственных средств терапии и профилактики заболеваний, связанных с нарушениями дифференцировки. Процесс терминальной клеточной дифференцировки эпителиальных клеток является одним из механизмов запрограммированной клеточной смерти и имеет много общих черт с апоптозом. В частности, в регуляции этих процессов важную роль играют белки семейства p53.

1.2 Эпидермальная дифференцировка

Эпидермис состоит из слоев кератиноцитов, включающих базальный слой несколько супрабазальных слоев. Базальный слой включает В себя эпидермальные стволовые клетки, которые при делении образуют пролиферативные единицы [20]. По мере продвижения в верхние слои эпидермиса, кератиноциты дифференцируются с последующей стратификацией и образованием рогового слоя. Баланс между пролиферацией клеток базального слоя и дифференцировкой клеток супрабазальных слоев необходим для поддержания гомеостаза эпидермиса. Поддержание пролиферативного потенциала клеток базального слоя в значительной степени связано с адгезией к базальной мембране, содержащей большое количество факторов роста и внеклеточного матрикса. Прикрепления клеток обеспечивается лигандов интегринами $\alpha_3\beta_1$ и $\alpha6\beta4$, способными к связыванию с ламинином [21].

В ходе эпидермальной дифференцировки происходит множество процессов на клеточном и молекулярном уровнях. Началом эпидермальной дифференцировки является выход базальных кератиноцитов из клеточного цикла с утратой адгезии к базальной мембране. При формировании шиповатого слоя подавляется экспрессия кератинов 5 и 14, характерных для базального слоя, активируется экспрессия ранних маркеров дифференцировки (Рисунок 1) – инволюкрина, трансглутаминазы, кератинов 1 и 10 [22].



Рисунок 1 – Схематичное изображение структуры эпидермиса и ключевых маркеров дифференцировки [23]

Прогрессия дифференцировки кератиноцитов *in vitro* характеризуется морфологическими изменениями клеток, связанными с формой клеток и выраженной трансформацией органелл. В процессе дифференцировки происходит появление и созревание кератогиалиновых гранул (КГГ) [24], ядерная конденсация и экструзия, коллапс цитоскелета [24, 25]. По мере продвижения кератиноцитов в гранулярный слой, активируется экспрессия маркеров поздних стадий дифференцировки - филаггрина, лорикрина. Эти белки способствуют укреплению барьерных функций за счет интеграции в нерастворимую клеточную оболочку и гидратации рогового слоя [26]. Кератины широко используются в качестве маркерных белков для различных стадий пролиферации или дифференцировки эпителиальных клеток, а также для диагностики эпидермальных заболеваний. В нормальной межфолликулярной коже экспрессия К14-К5 считается признаком базальных кератиноцитов, включая кластер клеток-предшественников, тогда как экспрессия K10-K1

отражает раннюю стадию дифференцировки кератиноцитов. Кроме того, экспрессия K6/K16/K17 в кератиноцитах представляет собой высокоактивированную и пролиферативную стадию при патологических состояниях [20]. Ключевые маркеры различных этапов дифференцировки и их физиологические функции приведены в таблице 1.

БЕЛОК	ЛОКАЛИЗАЦИЯ	ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ
Кератины 5/14	Базальный слой	Структурная
Ki67	Базальный слой, шиповатый слой	Неопределенная роль в клеточном делении, синтезе рРНК, поддержании митотического веретена
Кератины 1/10	Шиповатый слой	Структурная; участвует в программе корнификации
Инволюкрин	Шиповатый слой, гранулярный слой, роговой слой	Ороговение плазматической мембраны, матрикс для других белков
Лорикрин	Гранулярный слой, шиповатый слой	Основной компонент ороговевающей оболочки
Профилаггрин	Гранулярный слой	Прекурсор филаггрина
Активированная каспаза 3	Гранулярный слой	Регуляция апоптоза
Филаггрин	Роговой слой, гранулярный слой	Сшивка цитокератинов
TGM1	Роговой слой, гранулярный слой	Катализирует образование связей между лорикрином и инволюкрином
Кератины 6/16	Активированные кератиноциты	Структурная
Кератин 17	Контрактильные кератиноциты	Структурная; регуляция размера клетки и биосинтеза белка

Таблица 1. Маркеры для анализа стратификации эпидермиса.

Одним из ключевых факторов, регулирующих протекание эпидермальной дифференцировки, является градиент концентрации кальция, возрастающий от базального слоя к гранулярному [27]. У пациентов с болезнью Хейли-Хейли, вызванная мутацией в гене ATP2C1, кодирующем кальциевые каналы в аппарате Гольджи, наблюдается пониженная концентрация кальция в базальном слое эпидермиса, что приводит нарушению перехода от экспрессии базального кератина К14 к экспрессии К10 [28]. Примечательно, что нарушение липидноэпидермального барьера приводит к нарушению кальциевого градиента И снижению уровня маркеров дифференцировки – профилаггрина, инволюкрина и лорикрина [29]. При низких концентрациях кальция (0,03 мМ) кератиноциты пролиферируют и не способны к образованию рогового слоя. Увеличение концентрации кальция до 0,1 мМ приводит к изменениям в морфологии клетки и образованию межклеточных контактов – критически важного условия для реализации программы терминальной дифференцировки [30]. Образование контактов между клетками связано с перераспределением десмоплактина к клеточной мембране, образованию десмосом, «сшивке» клеток клаудинами и окклюдинами. В результате образования контактов между клетками возрастает внутриклеточная концентрация кальция [31]. С увеличением внутриклеточной в кератиноцитах последовательно концентрации кальция индуцируется экспрессия кератина 1, инволюкрина, трансглутаминазы-1, лорикрина и филаггрина [32].

При культивировании кератиноцитов *in vitro*, достижение состояния конфлюентности критично для завершения терминальной дифференцировки. Smits и соавторы продемонстрировали, что в условиях культивирования первичных кератиноцитов в монослое также наблюдается увеличение экспрессии маркеров дифференцировки (инволюкрина, лорикрина, филаггрина) и снижение маркеров пролиферации - *Ki-67* (*MKI67*), кератинов 5 и 14 [33].

1.3 Получение и генетические особенности линии НаСаТ

Культивирование клеток кожи *in vitro* остается актуальным с момента разработки методики культивирования кератиноцитов *in vitro* [34]. Культуры кератиноцитов и различные модели на их основе находят широкое применения в разных областях биомедицинских исследований, токсикологии *in vitro* и регенеративной медицине.

Модели кожи человека используются при изучении старения кожи, заболеваний, свойств моделировании различных а также для оценки косметических И терапевтических средств. В клинической практике реконструированная кожа используется в виде трансплантатов. Использование животных моделей является распространенной практикой, однако, данные, полученные на лабораторных животных, не всегда получается экстраполировать на человека в виду существенных межвидовых различий [35]. Помимо эпидермальных эквивалентов, кератиноциты человека могут быть использованы патологических [36]. лля исследования различных процессов В коже Кератиноциты человека могут быть использованы для исследований в области биологии эпидермальных клеток, токсикологии, моделирования воспалительных процессов. Однако, использование первичных кератиноцитов человека имеет существенные ограничения. Первичные кератиноциты нуждаются В специфичных ростовых факторах и добавках для культивирования in vitro. Также, по завершению дифференцировки первичные кератиноциты человека теряют способность к пролиферации и быстро умирают. Наконец, существует фактор донорской вариабельности, который может оказывать существенное влияние на воспроизводимость результатов [30]. В биологических и медицинских исследованиях широко распространено использование иммортализованных клеточных линий, в виду их доступности, гомогенности и воспроизводимости.

Линия кератиноцитов HaCaT была получена в результате спонтанной иммортализации материла, выделенного из биопсии кожи нормального фенотипа. Для ускорения пролиферации и ингибирования дифференцировки

клетки выращивали при низкой концентрации кальция (0,2 мМ) и повышенной температуре (38,5°С). Хромосомный состав клеток НаСаТ прослеживался начиная второго пассажа, В клетках которого уже наблюдались co множественные нарушения в структуре и количестве хромосом. Большинство клеток были гиподиплоидными и в среднем несли 44 хромосомы. К пятому пассажу клетки приобрели гипотетраплоидный набор хромосом, а также маркерную хромосому M4 4p18q. Для линии HaCaT характерна высокая скорость роста и пролиферации, что также вероятно связано характерными С цитогенетическими нарушениями [37].

Клетки линии HaCaT несут характерные для спонтанноиммортализованных линий мутации, наиболее значимыми из которых являются мутации «приобретения функции», или Gain-of-Function (GOF) в гене *TP53* -R282Q и H179Y [15]. Обе мутации связаны с заменами С→Т и СС→ТТ в кодонах 178-179 и 281-282, соответственно. Подобные мутации обнаруживаются в большинстве случаев плоскоклеточной карциномы кожи (54-90%) [10, 11].

Мутация H179Y (chr17: g.7675085C>T) представлена в 0,20% случаев различных типах рака, согласно базе данных ААСК GENIE, с наиболее высоким распространением в случаях аденокарциномы легкого, рака толстой кишки, молочной железы, меланомы, плоскоклеточной и базальноклеточной карциномы кожи [38, 39]. Данная мутация лежит в ДНК-связывающем домене (ДСД) ТР53 и связана с нарушением нормального функционирования. Данная мутация повышенной пролиферацией, миграцией, ассоциирована с инвазией, стабильностью белка p53 и повышенной способность к связыванию Eif4a1 и Ruvbl2 [40]. В случаях меланомы мутация H179Y ассоциирована с повышенной экспрессией PD-L1, инвазией и уклонением от иммунного ответа [41]. Мутация R282Q (chr17:g.7673775C>T) также лежит в ДСД ТР53, является мутацией приобретения функции и ассоциирована с раком кожи12,13. Результатом данной мутации является повышенная активация PCNA и MDR-1, а также высокая скорость пролиферации клеток в культуре [42, 43]. В клетках DLBCL p53 с

мутацией R282Q ассоциирован с высокой резистентностью клеток к доксорубицину [44].

Новые свойства мутантного р53 в НаСаТ реализуются посредством двух механизмов. Во-первых, мутантный p53 способен К димеризации с транскрипционными факторами р63 и р73, при этом подобные димеры либо не активны, либо обладают существенно меньшей способностью к связыванию с ДНК [45], [46]. Во-вторых, мутантный р53 способен активировать значительно мишеней путем прямого взаимодействия большее число с другими транскрипционными факторами (NF-Y, E2F1, NF-KB и VDR), или путем «перетаскивания» p63 к новым нетипичным сайтам связывания [15]. Геном клеток HaCaT содержит более 7000 элементов отклика мутантного p53, что значительно превышает число элементов отклика белка дикого типа. Мутантный р53 в клетках НаСаТ ассоциирован с повышенной скоростью роста и пролиферации [15]. В то же время, влияние данных мутаций на реализацию ключевых биологических функций р53 остается неизученным. В норме, белок р53 играет важную роль в регуляции пролиферации, клеточного цикла и апоптоза [47]. Мутантный р53 в клетках НаСаТ характеризуется более продолжительным временем полураспада и представлен в клетках на высоком уровне. Ранее сообщалось, что p53 в клетках НаСаТ участвует в регуляции UVBиндуцированного апоптоза и как минимум частично сохраняет свою функциональную активность [48, 49]. Однако, в литературе не встречаются данные о влиянии мутаций в p53 в клетках данной линии при воздействии других индукторов апоптоза.

Несмотря на высокую скорость роста и пролиферации, в определенных условиях клетки HaCaT способны к частичной реализации программы дифференцировки. При культивировании трансплантатов, полученных из клеток HaCaT, в коже иммунодефицитных мышей, в гистологических препаратах обнаруживался инволюкрин, при этом его экспрессия была строго ограничена верхними слоями эпидермиса. Также в гранулярном слое трансплантатов был обнаружен филагтрин. Кроме того, было показано, что в трансплантате хорошо различаются базальный и супрабазальные слои [37]. Кератиноциты HaCaT обладают свойствами базальных кератиноцитов, но проявляют способность к дифференцировке при повышении плотности клеток в культуре и под воздействием кальция. При культивировании *in vitro* с высоким содержанием кальция в среде клетки HaCaT экспрессируют классические маркеры дифференцировки – кератины 1 и 10, инволюкрин трансглутаминазу-1 [30, 50]. В виду значительного функционального и физиологического сходства с первичным кератиноцитами человека, линия HaCaT широко используется для изучения свойств кератиноцитов, моделирования эпидермиса и патологических состояний, в которые вовлечены кератиноциты [37, 51].

Несмотря на высокую степень сходства клеток НаСаТ и первичных кератиноцитов человека, существует ряд существенных различий между этими линиями. Например, воздействие цитокинами Th-клеток по-разному влияет на клетки HaCaT и NHK. Так, при воздействии интерферона-гамма (IFN_γ), интерлейкина 17А (IL-17А) и 22 (IL-22) в нормальных кератиноцитах наблюдались существенные изменения в экспрессии лорикрина, филаггрина, кератина 10, в то время как для клеток НаСаТ подобный эффект не наблюдался. Воздействие IL-4 привело к увеличению экспрессии филаггрина в клетках HaCaT, при этом в нормальных кератиноцитах наблюдался противоположный эффект. IFNy является важным иммуномодулирующим агентом и играет важную роль при защите клеток от вирусов. Одной из функций IFNy, специфичных для эпидермиса, является активации экспрессии белков плотных клеточных контактов для борьбы с вирусными инфекциями. В кератиноцитах, полученных от пациентов с атопическим дерматитом, IFNy значительно сильнее индуцирует апоптоз, чем в нормальных кератиноцитах [52]. Воздействие IFN_γ приводит к увеличению уровня TGM1 в первичных кератиноцитах, но не в клетках HaCaT, при этом экспрессия трансглутаминазы 2 (TGM2) и бета-дефенсина 2 (HBD2) возрастала в первичных кератиноцитах и в клетках HaCaT. Аналогичным

образом, IL-4 и IL-17А активируют экспрессию HBD2 в обеих линиях [51]. Одним из регуляторов ответа на воздействие цитокинов, экспрессируемых Thклетками, является MAP17 (*PDZK1*). В нормальных кератиноцитах уровень MAP17 значительно возрастает при экспозиции с IL-4, IL-6, IL-17A и IL-22 [53]. В клетках линии HaCaT MAP17 представлен на значительно более низком уровне, либо не экспрессируется вовсе [54]. Вероятно, различия в экспрессии маркеров дифференцировки между клетками HaCaT и NHK под действием Thцитокинов связаны с низкой экспрессией MAP17 [51].

культивировании При В формате кожных трансплантатов В иммунодефицитных мышах клетки HaCaT экспрессируют ключевые маркеры дифференцировки, однако, наблюдаются нарушения в организации тканей. Еще более выражены подобные нарушения в органотипических моделях при сокультивировании с фибробластами [55]. Дифференцировка нормальных кератиноцитов в значительной степени зависит от взаимодействия co стромальными клетками, в то время как этот механизм нарушен в клетках HaCaT. Регуляторный процесс инициируется высвобождением интерлейкина-1 в кератиноцитах, в результате чего происходит индукция фактора роста кератиноцитов (KGF/FGF-7) гранулоцитарно-макрофагального И колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в фибробластах. Уровень IL-1 в HaCaT KGF/FGF-7 И **GM-CSF** низок. a не экспрессируются при сокультивировании НаСаТ и фибробластов [56].

Тем не менее, добавление фактора роста кератиноцитов (KGF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) не приводит к стратификации и терминальной дифференцировке клеток HaCaT. Кроме HaCaT существенно того. клетках снижена экспрессия В трансформирующего ростового фактора альфа (TGF-α), аутокринного фактора роста кератиноцитов. Однако, добавление TGF- α в сочетании с IL-1, или KGF/GM-CSF, способствует более достижению поздних сталий дифференцировки HaCaT и формированию при многослойном культивировании

структур, приближенных к дифференцированным первичным кератиноцитам [56].

1.4 Сравнение клеток линии НаСаТ и нормальных кератиноцитов

Кератиноциты составляют около 95% эпидермиса, чем обусловлен интерес к использованию этих клеток для изучения регенерации [57], иммунного ответа [58], дифференцировки клеток [59], клеточной адгезии и многих других физиологических процессов. Для изучения свойств эпидермиса и кератиноцитов наряду с первичными клетками широко используются иммортализованные клеточные линии. Однако, иммортализованные линии могут существенно отличаться от первичных кератиноцитов и во многих случаях неясно, насколько точно такие клетки моделируют ситуацию *in vivo* [60]

Кератиноциты HaCaT являются одной из наиболее предпочтительных альтернатив первичным кератиноцитам для дерматологических исследований, так как клетки данной линии демонстрируют лишь незначительные отклонения от нормальных кератиноцитов, а нарушения хромосомной организации не привели к проявлению фенотипа трансформировавшихся клеток [37]. Несмотря на некоторые нарушения программы терминальной дифференцировки, линия HaCaT часто используется при исследовании процессов регуляции клеточного цикла и апоптоза. Кроме того, между клетками HaCaT и первичными кератиноцитами существуют лишь незначительные различия в регуляции метаболизма липидов [61].

Клетки HaCaT часто используются для изучения клеточных процессов, связанных с внутриклеточным матриксом, клеточной адгезией и миграцией. Однако, протеомные исследования показывают, что в клетках HaCaT заметно подавлена экспрессия белков, относящихся к этим процессам [56]. Перечисленные выше функции тесно связаны или контролируются посредством взаимодействия со стромой. В клетках HaCaT нарушен данный механизм регуляции [55]. Одной из возможных причин данного явления может быть сниженная экспрессия IL-1. который способствует пролиферации кератиноцитов счет индукции экспрессии фактора роста кератиноцитов (KGF) за И колониестимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) в фибробластах по механизму двойной паракринной обратной связи [55], что приводит к нарушениям дифференцировки кератиноцитов. Культивирование в органотипических культурах, или пересадка трансплантатов иммунодефицитным мышам компенсирует подобные нарушения, в результате чего клетки НаСаТ с некоторой задержкой восстанавливают способность к дифференцировке образованию стратифицирующего терминальной И эпидермиса [60].Добавление TGF-а в среду культивирования приводит к восстановлению уровня экспрессии II-1 и рецепторов KGF и GM-CSF, что также приводит к нормализации дифференцировки [62]. Однако, при культивировании в отсутствии сыворотки было обнаружено, что уровень экспрессии IL-1 в клетках НаСаТ был снижен в 16 раз, а уровень рецептора EGF напротив – был выше в два раза [56].

Протеомное исследование показало, что в клетках НаСаТ наиболее заметно подавлены белки, связанные с юкстакринной регуляцией и внеклеточным матриксом, в частности – ламинин-332. Данный белок намного более эффективно способствует клеточной адгезии, чем другие белки межклеточного матрикса и может играть важную роль в эпителиально-мезенхимальном переходе [55]. В условиях культивирования in vivo в мышиной модели кератиноциты HaCaT начинают формировать базальную мембрану за счет секреции ламинина-332 спустя несколько суток культивирования [63]. При культивировании в бессывороточной наблюдалось среде снижение уровня компонентов полипептидной цепи ламинина-332 приблизительно в 10 раз [56]. Также клетки НаСаТ характеризуются подавленным уровнем экспрессии комплекса ламинина-5, включающего ламинины -α3, -β3, и -γ2, чем обусловлена повышенная подвижность HaCaT по сравнению с первичными кератиноцитами [56].

Для исследования свойств кератиноцитов и создания органотипических моделей эпидермиса использование первичных кератиноцитов является предпочтительным в случаях, где это возможно. Однако, данный подход не всегда является доступным, поэтому использование иммортализованных кератиноцитов может быть более рентабельным. Линия НаСаТ является одной наиболее хорошо изученных линий кератиноцитов, которая находит широкое применение в качестве альтернативы первичным кератиноцитам. Таким образом, воспроизводят свойства клетки HaCaT частично основные первичных кератиноцитов, а ключевые особенности данной линии связаны с новыми функциями р53, приобретенными в результате мутаций.

1.5. Биология гена ТР53

Транскрипционный фактор p53 кодируется геном *TP53*, и является одним из ключевых регуляторов клеточного цикла. Главной биологической функцией p53 является поддержание стабильности и однородности генома посредством элиминации мутантных клеток, или клеток, подверженных воздействию генотоксических стрессовых факторов. Данная функция p53 приобретает особенно большое значение в контексте супрессии опухолей, что подтверждают данные о том, что мутации в гене *TP53* встречаются в более, чем 50% раковых опухолей [2]. В виду своего биологического и клинического значения, белок p53 активно изучается с момента его открытия вот уже более 40 лет. За это время было обнаружено, что p53 участвует во многих клеточных процессах, включая репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла и апоптоза, метаболизма и передачи сигнала [2]. Белок p53 реализует свою контролирующую функцию в ответ на воздействие различных факторов (микроокружения клеток, факторов стресса, генотоксических агентов), которые могут привести к повреждению генетического материала и размножению трансформировавшихся клеток [64].

Активности р53 имеют различную природу, но наиболее изучено его участие в различных процессах в клетке в качестве транскрипционного фактора.

23

Геном человека содержит более 350 генов-мишеней p53, причем p53 может являться как негативным, так и позитивным регулятором транскрипции [65]. Транскрипционный фактор p53 способен связываться с последовательностью Pu,Pu,Pu,C,A/T,A/T,G, Py,Py,Py, где Pu – пурин, Py – пиримидин. Часто этот участок дублируется и включает вариативный спейсер между повторами [66]. Геном человека содержит множество элементов отклика p53, которые представлены двумя повторами последовательности Pu,Pu,Pu,C,W,W,G,Py,Py,Py (где Pu – пурин, W – аденин/тимин, Py – пиримидин) [67].

Широкая сигнальная сеть позволяет p53 реагировать на множество процессов в клетке для предотвращения пролиферации клеток с поврежденным генетическим материалом. Белок p53 не является непосредственным участником ключевых процессов, необходимых для жизнедеятельности (Рисунок 2). Его экспрессия в нормальных клетках поддерживается на низком уровне [68]. Тем не менее, вне зависимости от условий, *TP53* непрерывно экспрессируется, хотя белок p53 дикого типа характеризуется чрезвычайно коротким периодом полураспада. При этом, нокаут *TP53* не приводит к моментальной гибели организма. Мыши, дефицитные по p53 имеют нормальный фенотип, однако, восприимчивы к спонтанному образованию опухолей [69].

Белок p53 не является непосредственным регулятором таким процессов, как дифференцировка, пролиферация, метаболизм, старение и апоптоз клеток, однако, играет центральную роль в устранении клеток, в которых протекание этих процессов отклоняется от нормы. Мыши, гетерозиготные по *TP53*, проявляют высокую устойчивость к искусственно-индуцированному канцерогенезу в коже, в то время как дефицитные по p53 (-/-) мыши умирают от спонтанного канцерогенеза с течение 4-5 месяцев от рождения [70].



Рисунок 2 – Схематичное изображение процессов, в регуляции которых участвует p53

В клетках эпидермиса белок p53 выполняет защитную функцию посредством устранения клеток, подверженных генотоксическим факторам, таким как облучение ультрафиолетом. Нарушения функционирования p53 могут предшествовать возникновению новообразований в коже, во многих случаях онкологических заболеваний кожи обнаруживаются УФ-индуцированные мутации в гене *TP53* [71].

Супрессия опухолей в значительной степени связана с взаимодействием в митохондриях p53 с регуляторами апоптоза. В клетках эукариот можно выделить два ключевых пути апоптоза: путь, регулируемый BCL-2 (внутренний путь), который активируется под действием различных стрессовых факторов, и внешний путь, который регулируется рецепторами фактора некроза опухоли [70]. Внутренний путь инициируется благодаря транскрипционной и/или посттранскрипционной регуляции проапоптических белков семейства BCL-2

(BIM, BAD, PUMA, BMF, BIK, NOXA). Проапоптические белки способны к связыванию антиапоптических белков (BCL-2, BCL-XL, MCL-1), тем самым высвобождая эффекторы клеточной гибели ВАХ и ВАК [72]. Примечательно, что p53 способен регулировать как про-PUMA, NOXA), (BAX, так и антиапоптические белки (p21, 14-3-3 с) [73]. PUMA и, в меньшей степени, NOXA имеют решающее значение для p53-опосредованного апоптоза в широком диапазоне типов клеток, включая лимфоидные и миелоидные клетки. фибробласты и кератиноциты кожи в культуре, так и in vivo [70]. Помимо регуляции апоптоза в качестве транскрипционного фактора р53 обладает также и митохондриальными функциями. Активированный р53 способен к прямому взаимодействию с белками семейства Bcl, что приводит к нарушению проницаемости наружной мембраны митохондрий и индукции апоптоза [74].

Многие опухоли, вызванные мутациями в ТР53, характеризуются высоким уровнем экспрессии мутантных форм кодируемого белка. В то же время, в подобных другие аллели гена часто полностью утеряны [75]. Фактически, высокий уровень экспрессии мутантного белка р53 может использоваться в качестве диагностического маркера рака, вызванного мутациями в гене ТР53. Высокая экспрессия мутантных форм р53 может приводит к прогрессии опухоли тремя способами: (1) в результате потери активности р53 дикого типа, (2) вследствие доминантного негативного эффекта, вызванного образованием смешанных тетрамеров, включающих как мутантные формы белка, так и белок приобретенной дикого типа, (3) В результате активности, de novo. опосредованной взаимодействием мутантного белка р53 с другими факторами транскрипции и опухолевыми супрессорами (например, p63, p73) [76].

Инактивация p53 в кератиноцитах с помощью PHK-интерференции приводит к увеличению чувствительности к воздействию УФ-излучения и активации апоптоза [70]. Подавление экспрессии p53 в нормальных кератиноцитах привело к увеличению восприимчивости кератиноцитов к IFN-α и IFN-γ-индуцированному апоптозу. Подобный механизм реализуется путем

активации сигнального пути TRAIL и его взаимодействию с рецепторами смерти. Кроме того, подавление p53 в кератиноцитах стимулирует МҮСиндуцированную дифференцировку кератиноцитов и увеличению классических маркеров дифференцировки – инволюкрина, кератина 1, 10, филаггрина. Такие клетки характеризуются потерей пролиферативного потенциала и ускоренной стратификацией. Наряду с этим есть данные, что в норме уровень p53 повышается при делении клетки и снижается при дифференцировке [77].

Белок p53 также является регулятором клеточного старения. Данная функция реализуется посредством активации p21 или p16^{INK4A}-опосредованной активации E2F, что приводит к аресту клеточного цикла и старению клетки. Регуляция клеточного цикла тесно связана с реализацией центральной функции p53 (обеспечения постоянства генома), так как остановка клеточного цикла для репарации является одним из механизмов ответа на повреждение ДНК [78].

1.5.1 Регуляция р53.

В нормальных клетках концентрация p53 поддерживается на низком уровне, что достигается за счет деградации p53 в системе 26S и 20S протеасом [74]. Одним из ключевых регуляторов p53 является E3 убиквитин-протеин-лигаза (MDM2). Ген *MDM2* является прямой транскрипционной мишенью p53; рост уровня p53 в клетке приводит к активации экспрессии *MDM2* и убиквитин-опосредованной деградации p53 [79].

Классический механизм активации p53 инициируется путем ATM/ATRопосредованного фосфорилирования. Фосфорилированный p53 связывается с целевыми генами и привлекает клеточную машинерию (TBP, TFIID) для инициации транскрипции. Фосфорилирование p53 может осуществляться широким спектром киназ, таких как ATM/ATR/DNA-PK, Chk1/Chk2. Фосфорилирование по остатку серина Ser15 ингибирует взаимодействие с MDM2 и, как следствие, приводит к стабилизации p53 [80]. Однако, существуют другие убиквитин-лигазы, регулирующие уровень p53, например, COP1, Pirh2, ARF-BP1. Важным регулятором Mdm2 является опухолевой супрессор ARF. ARF препятствует взаимодействию MDM2-p53, что в свою очередь приводит к стабилизации p53 [81]. Ключевые аспекты регуляции и протеасомной деградации p53 приведены на рисунке 3.



Рисунок 3 – Регуляция и протеасомная деградация р53 [74]

1.5.2 Структура гена ТР53 и его изоформ

Гены, кодирующие белки семейства p53, имеют гомологичную структуру (Рисунок 4). Для всех белков семейства p53 характерно наличие множества изоформ в результате наличия двух промоторов (P1 и P2 располагаются в экзоне 1 и интроне 4 соответственно) [82]. В результате альтернативного сплайсинга образуется множество изоформ, которые можно разделить на две группы – ТА-изоформы, и ΔN-изоформы, усеченные по N-концевому домену в результате транскрипции со второго промотора [83]. Кроме того, сплайс-формы гена *TP53* представлены 6 изоформами: α, β, δ, ε, γ, ζ [68, 84]. Полноразмерный белок p53

(full length, FL p53) включает 393 аминокислотных остатка, образующих 3 функциональных домена: домен, участвующий в активации транскрипции (TA, TAD), ДНК-связывающий домен (ДСД, DBD), домен олигомеризации (ДО, OD) [82].



Рисунок 4 – Структура генов и изоформ белков семейства р53 [84]

На сегодняшний день описано 12 изоформ p53, которые кодируются транскриптами: p53α, p53β, p53γ, Δ40p53α, Δ40p53β, Δ40p53γ, Δ133p53α, Δ133p53β, Δ133p53γ, Δ160p53α, Δ160p53β, Δ160p53γ [85–87]. Наличие такого числа изоформ связано с комбинацией альтернативных промоторов (P1 и P2), альтернативного сплайсинга и альтернативной инициации трансляции [87]. Изоформы p53 оказывают различное физиологическое действие, а их экспрессия зависит от локализации и физиологического состояния клеток. Примечательно,

что разные изоформы p53 могут оказывать противоположенное действие. Так, изоформы P53β/γ способствуют аресту клеточного цикла и клеточному старению путем индукции p21. Изоформы Δ133p53 напротив, стимулируют пролиферацию клеток путем модуляции транскрипционной активности p53 [88].

1.5.3 Гомологи р53

В процессе эволюции появилось два структурных гомолога p53 – p63 и p73. Все белки семейства p53 являются транскрипционными факторами и характеризуются значительной степенью гомологии. Белки p63 и p73 также способны к активации механизмов апоптоза и аресту клеточного цикла путем активации генов-мишеней p53. Однако, каждый из белков семейства p53 обладает уникальными функциями, о чем свидетельствуют существенные изменения фенотипа мышей, дефицитных по p63 и p73 [89].

У человека гены, кодирующие р53, р63 и р73 (ТР53, ТР63 и ТР73 соответственно), расположены в хромосомах 17р13.1, 3q27-29 и 1р36.2-3 соответственно. Для всех генов этого семейства характерно образование изоформ в результате альтернативного сплайсинга [90]. В отличие от р53, который относительно равномерно представлен во многих тканях и органах человека, р63 и р73 преимущественно экспрессируются в эпителиальных тканях с наиболее высоким содержанием в коже [91]. Экспрессия изоформ р63 зависит от типа клеток: полноразмерный белок TAp63 преимущественно экспрессируется в клетках зародышевых линий, в то время как изоформа ΔNp63 базальном многослойном В основном представлена в И эпителии. Полноразмерный р53 напротив, экспрессируется практически во всех тканях [92]. Полноразмерные изоформы р53а, ТАр63а и ТАр73а выполняют функции супрессоров опухолей [93]. Кроме того, р73 участвует в развитии нейронов, дифференцировке клеток реснитчатых эпителиев и метаболизме [94], при этом его роль в морфогенезе и гомеостазе эпидермиса не описана. Белок р63 в свою очередь является центральным регулятором программы развития И дифференцировки эпидермиса [95] и обладает онкогенными свойствами [96].

Конечной стадией образования развития является кожи стратифицирующего эпидермиса и различных придатков, способных к самообновлению. Транскрипционный фактор p63 является ключевым регулятором программы эпидермального развития и дифференцировки [97]. У мышей развитие эпидермиса начинается после активации экспрессии ∆Np63 в клетках эпителиальной эктодермы. Инактивация р63 у мышей приводит к нарушению развития эпидермиса и других эпителиев, волосяных фолликул, зубов, конечностей и внешних половых органов [98].

Изоформы ТАр63 представлены преимущественно в кератиноцитах базальных слоев, в то время как ΔNp63 экспрессируются в более высоких слоях эпидермиса [99]. ТАр63 также экспрессируется в ответ на различные стрессы и при заживлении ран [100]. Центральная роль изоформ ΔNp63 состоит в управлении программой развития эпидермиса, в то время как TAp63 поддерживает клетки эпидермиса в состоянии покоя с целью сохранения пролиферативного потенциала и несвоевременной дифференцировке [100].

Тонкое процессом дифференцировки обеспечивается управление транскрипционной регуляцией белком p63 нескольких групп генов, ответственных за регуляцию клеточной пролиферации, адгезии, организации цитоскелета, репарации ДНК, транскрипции и ремоделировании хроматина [82, 97]. В базальных слоях р63 индуцирует экспрессию цитокератинов 5 и 14, белков клеточной адгезии (Р-кадгерин, интегрин-α3, дистотин), регуляторов клеточного матрикса (Fras-1) и других транскрипционных факторов (AP-2y, IKK-a, IRF6, HBP1, Runx1, ZNF750), а также гены репарации ДНК (BRACA2, MRE11, Rad51) [97, 101]. Белок р63 поддерживает пролиферацию кератиноцитов базального слоя путем репрессии антипролиферативных генов, таких как 14-3-3s, p16/Ink4a, p19/Arf, p21 [100, 102, 103]. Помимо генов, связанных с регуляцией клеточного цикла, p63 регулирует некоторые компоненты сигнального пути Notch (Notch1, Hes1), Smad7, а также костный морфогенетический белок (BMP) [104, 105].

Важным классом мишеней р63 являются гены, кодирующие микроРНК [106]. Изоформы ТАр63 способны к транскрипционной активации промотора Dicer [107]. Одним из механизмов регуляции клеточного цикла является прямое транскрипционное ингибирование белком р63 некоторых микроРНК семейства miR-34, активация которых приводит к аресту клеточного цикла в фазе G1 [108]. р63 напрямую ингибирует экспрессию miR-138, miR-181a/b, miR-130b в первичных кератиноцитах [109]. В свою очередь, некоторые микроРНК экспрессию p63. Так, miR-203, miR-720 регулируют И mir-574-3p, экспрессирующиеся в эпидермальных кератиноцитах, ограничивают экспрессию р63 на уровне базальных клеток [110, 111].

Помимо транскрипционной активности белков семейства p53, важным аспектом является взаимодействие между членами семейства. Практически сразу после открытия белка p63 в 1998 году стало известно, что как полноразмерная изоформа TAp63, так и усеченные изоформы ΔNp63 способны взаимодействовать с сайтами узнавания p53. Позднее было обнаружено, что изоформы ΔNp63 не имеют каноничного TAD и являются доминантнонегативными регуляторами других членов семейства p53 [112].

Важную роль в реализации биологических функций белков семейства p53 играет олигомеризация. Белок p53 связывается с сайтами узнавания ДНК в виде тетрамеров, что также относится и к другим членам семейства [113]. Общая топология тетрамеров p53 может быть описана следующим образом: два первичных димера p53 стабилизируются за счет бета-листов и образуют тетрамер. Доменная структура белков p63 и p73 в значительной степени гомологична p53, однако, существуют некоторые заметные различия в С-концевой области белков p63 и p73, включающей уникальные структурные элементы. Оба белка содержат расширенную С-концевую область, которая также включает стерильный альфа-мотив (SAM) и ингибиторный домен [113]. Последовательности доменов олигомеризации p63 и p73 на ~40% идентичны последовательности соответствующей области p53. Гомотетрамеры p63 и p73

способны к слабому взаимодействию между собой, однако, не способны к взаимодействию с p53 [114]. Однако, некоторые мутации в p53 (например, R175H), приводят к изменению конформации белка, в результате чего существенно возрастает способность к связыванию димеров p63 и p73. В то же время, мутации, не оказывающие значительного влияния на конформацию, не приводят к аналогичным результатам. Интересно, что MDM2, главный негативный регулятор p53, способен ингибировать связывание p63 с p53^{R175H}, но усиливать взаимодействие p53^{R273H} с p73. Подобное явление предположительно может быть связано с тем, что MDM2 конкурирует с p63 за связывание с p53^{R175H} с целью восстановления активности p63 [115].

1.6 Мутации в ТР53 и их роль в прогрессии рака кожи

Рак кожи является наиболее распространенным видом рака во всем мире, и заболеваемость им растет. К основным типам рака кожи относятся меланома, базальноклеточная карцинома кожи и плоскоклеточная карцинома кожи (ВСС и SCC, соответственно). Меланома возникает из меланоцитов, в то время как ВСС и SCC происходят из базальных клеток интерфолликулярного эпидермиса и эпидермальных кератиноцитов, соответственно [116]. Острая плоскоклеточная карцинома кожи является наиболее распространенным метастатическим раком кожи, а большинство мутаций, детектируемых при SCC, являются УФиндуцируемыми[116]. Наиболее ранним событием в прогрессии SCC являются мутации в *TP53* [10], что приводит к нарушению реализации каноничных функций p53 и накоплению других онкогенных мутаций, в том числе мутации потери функции в NOTCH1. Кроме того, мутации-драйверы SCC были идентифицированы в таких генах, как *NOTCH2*, *EGFR*, *HRAS*, *KRAS*, *PI3KCA* и других [3].

Наиболее важным фактором риска развития SCC является кумулятивное воздействие солнечного ультрафиолетового излучения. Прогрессия SCC начинается с возникновения участков актинического кератиноза, часть из которых может трансформироваться в острую плоскоклеточную карциному и инвазивную плоскоклеточную карциному (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Молекулярные особенности, связанные с развитием актинического кератоза, плоскоклеточной карциномы кожи in situ (cSCCIS) и инвазивной cSCC [3]

SCC характеризуется высокой степенью молекулярной гетерогенности и высокой частотой мутаций. При этом, для клеток SCC характерно наличие УФсигнатурных мутаций с преобладающими заменами С—Т [117]. Мутации в TP53 содержатся в 50-60% случаев SCC и в 95% случаев инвазивной SCC, что подчеркивает роль воздействия УФ в прогрессии заболевания [117]. Диапазон мутаций в ТР53 в случаях плоскоклеточной карциномы чрезвычайно широк, однако, не все мутации имеют одинаковое значение. Как и во многих других типах рака, миссенс-мутации в ДСД р53 часто детектируются в случаях SCC. Некоторые положения нуклеотидов последовательности ДСД *TP53* В подвержены исключительно высокой частоте мутаций. Одна из таких точечных мутаций в SCC часто детектируется в аминокислотном остатке 248 (например, R248W/R248O), который непосредственно взаимодействует ДНК. с Мутировавший белок p53 не может связываться с ДНК и активировать свои генымишени. Это потенциально может блокировать р53-опосредованную остановку роста клеток и апоптоза и приводить к накоплению мутантного р53, отчасти потому, что он более стабилен, чем р53 дикого типа, а в случае мутантного р53 отсутствует функциональная реакция отрицательной обратной связи со стороны MDM2, основного антагониста p53 [118]. Мутантный p53 может приобретать специфическую онкогенную активность, связанную с усилением функции (GOF), такую как усиление передачи сигналов, способствующих росту, метастазирование Отличительной функцией инвазивность И опухоли. мутантного р53 является его способность связываться с другими факторами транскрипции, гистон-модифицирующими белками или комплексом инициации транскрипции для активации транскрипции [119]. Кроме того, мутантный р53 может нарушать функцию p53 дикого типа или других членов семейства p53, p63 или р73, образуя комплекс с мутантным р53 и белками дикого типа р53/р63/р73, чтобы ингибировать их ДНК-связывание и активацию генов-мишеней [119]. Потеря каноничных функций р53 также приводит к уклонению от апоптоза, что приводит к клональной экспансии мутировавших клеток и прогрессии рака, а различные точечные мутации в *ТР53* могут быть признаком ранних стадий канцерогенеза [3].

Резюмируя литературные данные, можно выделить следующие механизмы реализации новых функций мутантного p53:

1) миссенс-мутации в ДНК-связывающем домене *TP53* могут нарушать связывание белка p53 с регуляторными участками гена и предотвращать транскрипцию генов-мишеней дикого типа p53;

2) мутации в *TP53* могут усиливать регуляцию процессов пролиферации, роста, инвазии и метастазирования;

 мутантный p53 может связывать другие факторы транскрипции и «перетаскивать» их к соответствующим элементам отклика, или напротив, препятствовать их транскрипционной активности;

4) мутантный p53 может ингибировать p53 дикого типа или другие белки семейства (p63, p73) [3, 15, 45, 120].

Некоторые мутации в *TP53*, например, p53^{V154A/R155C}, p53^{H175H/H176Y}, повидимому, могут обеспечить различные преимущества В выживании кератиноцитов при отсутствии хронического облучения [121]. Исследование GOF-активности различных форм p53 имеет высокое значение для терапии, так как подобные мутантные формы могут усиливать рост опухоли. Ранее на клетках НаСаТ было показано, что мутантный p53 кооперирует с NF-kB, что приводит к усилению апоптоза посредством продукции фактора некроза опухоли (TNF, от англ. Tumor Necrosis Factor) в ответ на UVB в присутствии IL-1. Поскольку кожа человека постоянно подвергается воздействию ультрафиолетового излучения, вызывает выработку IL-1, подобные результаты позволяют что также предположить, что значительное количество мутаций в ТР53 в эпидермисе может выполнять защитную функцию для устранения предраковых клеток на ранней стадии [122].

1.7 Некодирующие РНК в регуляторной сети р53

Как обсуждалось выше, функция р53, подавляющая опухоль, часто утрачивается при раке, особенно при раке кожи, и мутировавший р53 может приобретать онкогенную активность GOF. В дополнение к белкам, которые взаимодействуют с мутировавшим р53 для трансактивации специфических генов-мишеней при раке, также было показано, что длинные некодирующие РНК (lncRNA) участвуют в патогенной передаче сигналов через мутантный p53 [3]. Например, было показано, что lncRNA MALAT1, которая обычно активируется при раке, взаимодействует с мутировавшим р53 в случаях рака молочной железы. Некоторые lncRNA могут регулировать p53 или его подконтрольные гены мишени. В то же время, сами lncRNA, например, NORAD (некодирующая PHK, ДНК), В повреждение являются активируемая ответ на прямыми транскрипционными мишенями p53 [123]. Аналогичным образом, lncRNA PANDA способствует выживанию клеток и ингибирует апоптоз, a lncRNA GUARDIN поддерживает стабильность генома [124].
Недавние исследования проливают свет на роль некодирующих РНК в прогрессии рака кожи. Однако, лишь в нескольких исследованиях сообщалось о взаимосвязи между p53 и lncRNA в случаях рака кожи. Ярким примером является IncRNA PRECSIT (P53 Regulated Carcinoma-associated STAT3 Activating long intergenic non-protein coding Transcript). PRECSIT активируется в случаях сSCC, а высокая экспрессия данного транскрипта специфически связана с потерей р53 в сSCC in vivo [125]. Экспрессия PRECSIT приводит к активации STAT3 и увеличению экспрессии ММР-1, ММР-3, ММР-10 и ММР-13. Матриксные металлопротеиназы-ММР-3 И MMP-10 способны разрушать несколько компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ), включая коллаген IV типа базальной мембраны, фибронектин и ламинин. Они также активируют латентные ММР-1 и ММР-13, способные расщеплять фибриллярные коллагеназы коллагены типа I и III в кожном покрове. Протеолитическое ремоделирование ВКМ и базальной мембраны под действием MMPs имеет важное значение для инвазии клеток cSCC и имплантации опухолевых клеток. [125]. Стоит отметить, что p53-регулируемые lncRNA привлекает большое внимание на протяжение последних лет. Несмотря на то, что р53 является одним из наиболее изученных белков, многие механизмы, вовлеченные в регуляцию подконтрольных р53 генов, Исследование взаимосвязи остаются малоизученными. между p53 И некодирующими РНК является перспективным направлением, которое может пролить свет на неизвестные аспекты в биологии p53[126].

1.8 Эпителиально-мезенхимальный переход и опухолевая трансформация в

клетках НаСаТ

Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) является важным медиатором трансформации клеток и прогрессии опухоли [127]. В процессе ЭМП клетки теряют эпителиальные свойства и приобретают свойства мезенхимальных клеток. В частности, клетки теряют апикально-базальную полярность и способность к формированию плотных межклеточных контактов

[128]. Другими важными характеристиками ЭМП являются повышенная скорость миграции и значительные изменения в организации цитоскелета [129]. Клетки могут претерпевать как полный, так и частичный ЭМП, при котором клетки обладают промежуточным фенотипом. Как правило, при прогрессии опухолей, ЭМП способствует увеличению инвазивности трансформировавшихся клеток [130].

Наиболее вероятно, что иммортализация клеток НаСаТ является следствием UV-сигнатурных мутаций в гене *ТР53*, которые часто детектируются в клетках карцином различного типа [131]. Кроме того, в клетках HaCaT утрачены некоторые локусы хромосом 3р, 4р и 9р, в которых были идентифицированы гены, ассоциированные со старением [132]. С одной стороны, клетки HaCaT проявляют фенотип нормальных кератиноцитов, способны эпидермальной К частичной реализации программы дифференцировки, несут стабильный состав хромосом И остаются неопухолевыми на протяжении 320 пассажей [13, 132]. Однако, в связи со значительными генетическими нарушениями клетки данной линии могут рассматриваться в качестве модели начальных стадий канцерогенеза. Опухолевая трансформация клеток HaCaT возможна в результате трансфекции онкогеном Harvey-ras (val-12), а также при культивировании при повышенной температуре (имитация солнечного ожога) [133]. В других исследованиях было показано, что к опухолевой трансформации клеток НаСаТ может приводить хроническое воздействие UVA [134], воздействие металлов, таких как литий и мышьяк [135, 136]. Процесс трансформации в клетках НаСаТ характеризуется приобретением злокачественного фенотипа, который проявляется в увеличении инвазивности, проявлении признаков ЭМП, активации сигнальных путей NF-kB и PI3K/AKT.

Клетки HaCaT проявляют признаки ЭМП в ответ на действие трансформирующего ростового фактора бета-1 (TGF-β1, *англ*. Transforming Growth Factor Beta-1), что проявляется в изменениях, связанных с организацией цитоскелета, снижению белков эпителиальных контактов (ZO-1, E-кадгерина), увеличению скорости миграции [137–139]. При этом, экспрессия маркеров мезенхимальных клеток при индукции ЭМП в HaCaT не отмечается, что свидетельствует о том, что клетки данной линии способны к реализации промежуточного фенотипа.

Подобными свойствами клеток HaCaT обусловлен интерес к данной линии в качестве модели для исследования процессов, происходящих при опухолевой трансформации. Отдельно стоит отметить, что роль p53 в данном процессе остается неизученной, однако, представляет большой интерес, так как мутации, влекущие функциональную дисфункцию p53, являются ключевым двигателем прогрессии опухоли на ранних стадиях [3, 140].

Таким образом, потеря каноничных функций p53, а также приобретение новых функций в результате мутаций, имеет критическое значение в процессе опухолевой трансформации и прогрессии опухоли. Исследование особенностей мутантных форм актуально для диагностики и терапии различных заболеваний, включая онкологические заболевания кожи. Принимая во внимание чрезвычайно высокую частоту мутаций в *TP53* в кератиноцитах человека, подверженных воздействию УФ-излучения, функциональная характеристика мутантных форм p53, несущих УФ-сигнатурные мутации, представляет большой интерес. Спонтанно-иммортализованные кератиноциты линии HaCaT несут независимые УФ-сигнатурные мутации в обеих аллелях *TP53*, однако, имеют фенотип нормальных кератиноцитов, что задает предпосылки к использованию этой линии в качестве модельного объекта для характеристики особенностей мутантного p53 с выраженной GOF-активностью.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объект исследования

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, CША) с добавлением 1% GlutaMAXTM (Thermo Fisher Scientific, США), раствора пенициллина/стрептомицина (100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно, Gibco, США) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, от *англ*. Fetal Bovine Serum) (Диа-М, Россия) - полная культуральная среда. Клетки выращивали в культуральных флаконах площадью 25 см² или в чашках Петри диаметром 60/90 мм (Corning, США). Среду заменяли на свежую каждый второй день культивирования.

Криоконсервацию клеточных культур проводили в экспоненциальной фазе роста. Клетки собирали трипсинизацией, после чего клеточные осадки растворяли в полной среде культивирования с добавлением 50% FBS и 10% диметилсульфоксида (ДМСО) (Helicon, Россия). Суспензии клеток помещали в пробирки для криоконсервации и замораживали при -20°C. Спустя 2 часа пробирки с культурами перемещали в низкотемпературный холодильник (-80°C) на 24-48 часов, после чего хранили в парах жидкого азота в криохранилище (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки размораживали в водяной бане при 37 °C в течение 1 минуты, после чего промывали 10 мл полной среды культивирования и пересевали в культуральные флаконы.

2.2 Получение клеточной линии с нокаутом гена ТР53

Нокаут *TP53* проводили с использованием системы CRISPR/Cas9n D10A. Генетические конструкции, кодирующие нуклеазу Cas9^{D10A} и парные направляющие gRNA, были встроены в плазмиду PX461 (Addgene #48873), несущую также репортер GFP. Встраивание направляющих PHK проводили по сайтам рестрикции BbsI. Последовательности олигонуклеотидов, кодирующих направляющие РНК для управления Cas9^{D10A}, приведены ниже:

gRNA-1 GGAAGCTCCCAGAATGCCAG gRNA-2 GCATTGTTCAATATCGTCCG

Для молекулярного клонирования и наработки плазмид использовали культуру *E. coli* XL-1 Blue (Евроген, Россия). Для трансформации компетентные клетки размораживали во льду в течение 30 минут, после чего к 100 мкл клеточной суспензии добавляли 100 нг плазмидной ДНК в объеме, не превышающем 10 мкл. Клетки инкубировали на льду в течение 30 минут, после чего подтвергали воздействия теплового шока (30с при 42°С), после чего культуру помещали в лед на 2 минуты. Далее клетки рассевали на плотную агаризованную среду LB (Диа-М, Россия), или выращивали в формате ночной культуры для наработки плазмид в аналогичной жидкой среде при 37°С и аэрации. Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Встраивание целевых фрагментов верифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Генетические конструкции были доставлены в клетки HaCaT путем трансфекции с использованием PEI 25К (Polysciences, CША) в качестве трансфицирующего агента. Для трансфекции клетки рассаживали в плотности $2,0\times10^5$ в 60 мм чашки Петри (Corning, США) и культивировали в стандартных условиях в течение 48 часов. За 1 час до трансфекции среду культивирования заменяли на 0,9 мл свежей среды. Для приготовления трансфицирующей смеси 2 мкг плазмид, кодирующих gRNA-1 и gRNA-2, растворяли в 50 мкл среды ОрtiMEM (Thermo Fisher Scientific, США), после чего добавляли к смеси равный объем раствора PEI 25К в OptiMEM. Финальная конецентрация PEI 25К составляла 1 мкг/мл. Трансфицирующую смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, после чего вносили в культуральную среду. Спустя 6 часов среду замещали на свежую. Клетки культивировали в течение 48 часов, после чего собирали трипсинизацией для последующей сортировки

популяции клеток по GFP. Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelodyTM Cell Sorter (BD Biosciences, США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дебриса и дуплетов. В негативного (контроля флуоресценции) использовали качестве контроля нетрансфицированные Одиночные GFP-позитивные клетки. клетки культивировали в 96-луночных планшетах (Corning, США) для последующего клонального анализа.

2.3 Анализ скорости пролиферации

Клетки рассаживали в лунки 6 луночного планшета и культивировали до 50% конфлюентности, достижения после чего клеткам добавляли К флуоресцентный краситель CytoTraceTM Red CMTPX (ААТ Bioquest, США). Спустя 1 час после внесения флуоресцентной метки среду культивирования замещали на свежую. При делении клеток краситель равномерно распределяется между дочерними клетками, поэтому скорость пролиферации коррелирует с интенсивностью флуоресценции. Уменьшение интенсивности флуоресценции (разбавление метки) отражает количество клеточных делений. Клетки контрольной группы собирали трипсинизацией спустя 1 час после замены среды и фиксировали в буферном растворе 4% формалина. Для сравнения скорости пролиферации клетки собирали и фиксировали спустя 48 часов после внесения красителя. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью проточного цитометра ZE-5 (Bio-rad, США) с использованием программного обеспечения Everest 2.4.0.1365 (Bio-Rad, CIIIA).

2.4 Детектирование апоптоза

Для детектирования апоптоза использовали набор Annexin V-FITC/PI Apoptosis Kit (Elabscience, CША). Клетки рассаживали в 6-луночного планшета или чашки Петри диаметром 60 мм (Corning, США). Клетки культивировали в

42

стандартных условиях до достижения конфлюентности 50-70%, после чего среду культивирования замещали на содержащую анализируемые субстанции (хлорид кадмия, СССР). Клетки культивировали в течение 24 часов, собирали трипсинизацией и окрашивали Annexin V-FITC/PI согласно протоколу производителя. Клетки анализировали с помощью проточного цитометра NovoCyte Flow Cytometer (Agilent, США) и ПО NovoExpress, версия 1.6.2 (Agilent, США).

2.5 Проточная цитометрия

Анализ экспрессии целевых белков (CD324, CD325, CD274) проводили с помощью проточной цитометрии. Клетки рассаживали в 6-луночные планшеты (Corning, CША) в плотности $3,0 \times 10^5$ клеток на лунку и культивировали в течение 48 часов. По завершению периода культивирования клетки собирали трипсинизацией, дважды промывали в растворе DPBS, после чего готовили суспензию клеток в растворе FACS Buffer (DPBS без Ca²⁺и Mg²⁺, 2 мМ EDTA, 1% FBS). Суспензии, содержащие 2 млн клеток/мл, смешивали с равными объемами растворов антител в FACS Buffer и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре в темноте, после чего промывали DPBS и анализировали с помощью цитометра NovoCyte Flow Cytometer (Agilent, CША) и ПО NovoExpress, версия 1.6.2 (Agilent, CША).

2.6 Иммуноблоттинг

Для анализа методом иммуноблоттинга клетки лизировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA-2Na, 1% Triton X-100, 0,1% дезоксихолата натрия и 0,1% SDS), после чего лизаты инкубировали при 4 °C в течение 30 минут и добавляли ¼ часть четырехкратного буфера Лэммли (62,5 мМ трис-HCl (pH 6,8), 60 мг/мл DTT, 10% глицерин, 0,2% SDS, 0,2% бромфенолового синего). Белки разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Для

каждой реакции использовали 50 мкг белкового лизата. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra (Bio-rad, CША) в течение 70 минут при силе тока 350 мА.

Мембраны блокировали в течение 5 минут в буфере EveryBlot (Bio-rad, США), после чего инкубировали с антителами к целевым белкам. Для визуализации использовали вторичные антитела, коньюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны инкубировали с первичными и вторичными антителами в течение 1 часа при мягкой ротации в комнатной температуре. Для детектирования сигнала использовали набор Clarity[™] Western ECL (Bio-rad, США). Изображения были получены с помощью системы документирования DNR LumiBis Gel Imaging System 3.2 с использованием ПО GelCapture (DNR, Израиль).

2.7 Транскриптомное профилирование

Для транскриптомного профилирования клетки WT и *TP53* KO HaCaT культивировали в 100 мм чашках Петри до достижения конфлюентности 70% в трех биологических повторах, после чего клетки собирали трипсинизацией. PHK выделяли с помощью набора RNEasy Kit (Qiagen, Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Транскриптомные данные были получены в результате высокопроизводительного секвенирования с помощью анализатора NovaSeq 6000 с длиной прочтения 100 пар оснований (Illumina, CША). Для подготовки библиотек использовали набор TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina, CША). Первичные данные были загружены в базу данных NCBI SRA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) с идентификатором PRJNA1005459. Анализ и визуализация данных была выполнена с помощью среды программирования R (версия 4.1). Анализ дифференциальной экспрессии генов был выполнен с помощью пакета DESeq2. Для визуализации данных использовали ПО EnhancedVolcano. ПО ClusterProfiler использовали для анализа обогащения по

функциональной принадлежности и визуализации данных. Для анализа экспрессии некодирующих РНК исползовали библиотеку GeneCode lncRNA (GRCh38, v46).

2.8 Анализ протеома клеточных линий

Для исследования клетки выращивали в стандартных условиях до достижения 70% конфлюентности или 72 часа после достижения полной конфлюентности в трех биологических повторах для каждой группы (WT и *TP53* KO HaCaT). Клетки собирали трипсинизацией, трижды промывали раствором DPBS, после чего полностью отбирали супернатант и замораживали осадки при -80°C до последующего анализа.

Гидролиз проводили в 100 мкл 2% дезоксихолате натрия в 50 мМ р-ре триэтиламмония бакорбаната (TEABC). Образец обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls, (Bandelin Electronic, Германия) 3 раза по 30 сек при температуре 0°С, центрифугировали со скоростью 10 000 g в течение 2 мин. В надосадочной жидкости измеряли концентрацию белка колориметрическим методом с помощью BCA Assay согласно протоколу производителя (Pierce, США).

Протеомный анализ пептидов был выполнен с помощью системы ВЭЖХ Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific, США) в тандеме с массспектрометром Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific, США). На колонку Acclaim µ-Precolumn (0,5 мм х 3 мм, размер частиц 5 мкм, Thermo Scientific) загружали 1 мкл пептидной смеси при потоке 10 мкл/мин в течение 4 минут в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы использовали буфер «С» (2% ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты в деионизированной воде). Далее пептиды разделяли на колонке для ВЭЖХ PeakyEfficiency (FE 100 мкм×30 см, размер частиц – 1,9 мкм) в градиентном режиме элюирования. Градиент был сформирован подвижной фазой «А» (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазой «Б»: (80% ацетонитрил, 0,1% водный раствор муравьиная кислота) при скорости потока 0,3 мкл/мин. В течение 10 мин колонку промывали 2% подвижной фазой «Б», после чего увеличивали концентрацию подвижной фазы «Б» до 35% в течение 68 мин. Затем, увеличивали концентрацию фазы «Б» до 99% в течение 2 мин. После 2 минутной промывки при 99% буфера «Б», концентрацию буфера «Б» снижали до исходных 2% в течение 3 мин.

Масс-спектрометрический анализ был выполнен с помощью массспектрометра Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме положительной ионизации с использование источника NESI (Thermo Fisher Scientific, США). Использовались следующие параметры настроек: напряжение на эмиттере 2.1 кВ при температуре капилляра 240°С. Панорамное сканирование проводили в диапазоне масс от 300 m/z до 1500 m/z, при разрешении 120,000. При тандемном сканировании разрешение устанавливали 15000 в диапазоне масс от 100 m/z до верхней границы, которая определяется автоматически исходя из массы прекурсора (не более 2000 m/z). Изоляцию прекурсорных ионов проводили в окне \pm 1 Да. Максимальное число разрешённых для изоляции ионов в режиме MS2 было установлено как <40, граница отсечения для выбора прекурсора для тандемного анализа бала установлена как 50000 единиц. Нормализованная энергия соударения (NCE) равнялась 29. Для тандемного сканирования учитывали только ионы от z = 2+ до z = 6+ по состоянию заряда.

Для идентификации белков использовали программное обеспечение MaxQuant v. 2.0.3.0 и поисковый алгоритм Andromeda. Для идентификации белков использовали базу данных протеома человека UniProt. Поиск осуществлялся при следующих параметрах: расщепляющий фермент - трипсин, с возможностью пропуска двух сайтов расщепления трипсином, точность определения масс моноизотопных пептидов ±4,5 ppm, точность определения масс в спектрах MS/MS ±20 ppm. Окисление метионина, ацетилирование N-конца белка были учтены как возможные, а карбамидометилирование цистеина как обязательная модификация пептидов, соответственно. При идентификации использовали опцию «Match between runs» с параметрами по умолчанию. Для

валидации сопоставлений (образования пар) спектров и пептидов PSM (Peptide-Spectrum Matches), идентификации пептидов и идентификации белков использовали величину FDR (False Discovery Rate) не более 1,0%. Белки рассматривались в качестве достоверно идентифицированных, если для них было обнаружено не менее двух пептидов. Количественная оценка содержания белков происходила на основе iBAQ и LFQ.

Первичные данные были опубликованы базе данных ProteomeXchange Consortium с присвоенным идентификатором PXD030700.

Статистический анализ белков с дифференциальной экспрессией между линиями WT и *TP53* KO HaCaT проводили с помощью программного обеспечения Perseus (версия 2.0.7.0).

2.9 Обратная транскрипция и ПЦР в реальном времени

РНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen, Нидерланды). Синтез кДНК осуществляли с помощью набора MMLV-RT Kit (Евроген, Россия), используя 1 мкг тотальной РНК для реакции. Реакцию ОТ проводили согласно протоколу производителя с использованием случайного декануклеотидного праймера. В качестве флуоресцирующего красителя использовали SYBR Green (Евроген, Россия). Реакции обратной транскрипции и ПЦР-РВ проводили с помощью амплификатора CFX Connect (Bio-rad, CША). Реакция ПЦР-РВ включала следующие стадии: схема амплификации включала следующие стадии: 95 °C 3 мин; $38 \times (95^{\circ}$ C - 10c, 60° C - 20c, 72° C - 30c). Анализ данных был выполнен с помощью ПО CFX MaestroTM 1.0, версия 4.0.2325 (Bio-rad, CША). Все реакции проводили в трех технических и трех биологических повторах. В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *ACTB*. Последовательности праймеров, использованных для анализа, приведены в таблице 2.

Ген	Forward	Reverse
GAPDH	5'- TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT - 3'	5'- ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTT -3'
ACTB	5'-TCAGAAGGATTCCTATGTGGGCGA- 3'	5'-CACGCAGCTCATTGTAGAAGGTGT- 3'
KRT10	5'-AGCATGGCAACTCACATCA-3'	5'-GTCGATCTGAAGCAGGATGTT-3'
KRT1	5'-GCGGACAAATGCAGAGAATG -3'	5'-TGCTTGGTAGAGTGCTGTAAG-3'
IVL	5'-CCAAAGCCTCTGCCTCAG-3'	5'-GTATTGACTGGAGGAGGAACAG-3'
PRECSIT	5'-CGAGGGTTGAACATTGTTGTGAC-3'	5'-CCACAGCTCCACCACTAGAC-3'

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

2.10 Послойное культивирование

Для органотипических получения трехмерных моделей клетки выращивали на границе раздела фаз жидкость-воздух в мембранных вставках (PES, диаметр пор 0,2 мкМ, NEST, Китай). 1 млн клеток растворяли в 500 мкл стандартной среды культивирования и вносили в апикальный отдел мембранной вставки, после чего заполняли лунки средой культивирования. Спустя 48 часов среду культивирования замещали на среду для послойного культивирования (DMEM/F12 с добавлением 2,8 мМ хлорида кальция, 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 2 нг/мл KGF и 10% FBS, Gibco, США). Среду культивирования полностью удаляли из апикального отдела для создания раздела фаз. Клетки культивировали в течение 14-21 дней. Среду культивирования замещали на свежую каждые 24 часа.

2.11 MTT-mecm

МТТ тест использовали для определения цитотоксичности исследуемых субстанций в клетках WT и *TP53* KO HaCaT. Клетки рассаживали в 96-луночные планшеты (Corning, США) в плотности 5,0×10³ клеток на лунку и культивировали в полной среде в течение 24 часов. Затем среду культивирования замещали на содержащую исследуемые вещества в различных концентрациях. В

контрольных группах среду культивирования замещали на свежую. Для определения цитотоксического эффекта хлорида кадмия использовали 24 бессывороточную среду культивирования. Спустя после внесения тестируемых веществ среду культивирования замещали на содержащую 1 мг/мл MTT И инкубировали (Диа-М. Россия) при стандартных **VCЛОВИЯХ** культивирования в течение 3 часов. По завершению инкубационного периода клетки трижды промывали раствором DPBS и лизировали в 100 мкл ДМСО, после чего измеряли оптическую плотность с помощью спектрофотометра iMark (Bio-rad, США) при 560 нм.

2.12 Оценка скорости миграции (Scratch-wound assay)

Скорость миграции оценивали путем моделирования повреждения эпидермиса *in vitro* (scratch-wound assay). Клетки WT и *TP53* KO HaCaT рассаживали в 96-лучночные планшеты Incucyte® Imagelock (Sartorius, Германия) в плотности $4,0\times10^4$ клеток на лунку за 24 до анализа. За 3 часа до нанесения повреждения среду культивирования замещали на бессывороточную, содержащую 10 мкг митомицина С (Sigma, США) для полной супрессии пролиферации. В контрольных группах среду замещали на свежую полную среду культивирования. Повреждение наносили с помощью скарификатора (Essen Bioscience, Германия), после чего клетки трижды промывали раствором DPBS и инкубировали в течение 24 часов в стандартных условиях в полной среде культивирования. Изображения были получены и обработаны с помощью системы Incucyte® ZOOM System (Sartorius, Германия). Для статистической обработки использовали данные от 5 и более технических повторов.

2.13 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Препараты фиксировали в 4%-м формалине. Подвергали стандартной гистологической обработке: дегидратировали в серии спиртов с возрастающей концентрацией и заключали в парафиновые блоки. Срезы изготавливали с помощью микротома. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки

инкубировали с первичными антителами к К5 (Abcam, США), К10 (ab9025; Abcam, США) и вторичными Alexa Fluor 488-конъюгированными (Abcam, США) или Texas Red-конъюгированными (Abcam, США) антителами. Все препараты подвергали окрашиванию одновременно с использованием единого набора реактивов (разведений антител и буферов).

Для анализа методом конфокальной микроскопии препараты фиксировали в 10% забуференном растворе формальдегида, пермеабилизовали 0,1% раствором Triton-X100 и блокировали 1% раствором БСА в PBS-Tween20TM в течение 20 минут. Для окрашивания использовали первичные антитела к K1 (Finetest, Китай) и вторичные антитела, конъюгированные с Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, США). Ноесhst 33342 использовали для окрашивания ядер (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения были получены с помощью сканирующего микроскопа Zeiss LSM 880.

Уровень генотоксического стресса оценивали путем иммунофлуоресцентного окрашивания гистона Н2А. летки высевали в 96луночные планшеты в плотности 5,0×10³ (Corning, Нью-Йорк, США) и культивировали в течение 24 часов. Затем культуральную среду заменяли на среду, содержащую хлорид кадмия (20 мкм), и инкубировали при стандартных условиях культивирования в течение 24 часов. Клетки дважды промывали PBS и фиксировали 4% раствором формальдегида. Клетки пермеабилизовали 0,1% раствором Triton X-100 (Helicon, Россия) и окрашивали первичным антителом к гистону H2A (ab18255, Abcam, Кембридж, Великобритания) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с Alexa 488 (Bio-rad, США), в течение 1 часа при комнатной температуре в темноте. Ядра окрашивали с помощью Hoechst-332 (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения были получены с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-rad, США). Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали с помощью программного обеспечения ImageJ [141].

2.14 Восстановление экспрессии p53 дикого типа в клетках ТР53 КО НаСаТ

Для восстановления экспрессии p53 дикого типа в клетках HaCaT с нокаутированным мутантным р53 последовательность ТР53 амплифицировали в ПЦР, используя синтезированную в результате реакции обратной транскрипции (ОТ) кодирующую последовательность TP53 (CCDS11118.1) в качестве матрицы. Реакция ОТ была выполнена с помощью набора MMLV Reverse transcription kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя с использованием Oligo(dT) праймера. РНК для реакции ОТ выделяли из кератиноцитов человека. Для амплификации нормальных выбранной последовательности были подобраны праймеры, содержащие сайты узнавания рестриктаз XmaI (CutSmart) и SphI для последующего встраивания продукта ПЦР в вектор доставки. Последовательности праймеров, использованных в ПЦР приведены ниже:

Forward 5'-CCCGCACCCGGGCCAATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC-3'

Reverse 5'-CCTCGTCGCATGCTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTG-3'

Для амплификации использовали высокоточную полимеразу Phusion^{тм} High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher, США) при следующей программе амплификации: 98 °C 3 мин, $38 \times (98 \text{ °C } 30 \text{ c}, 69 \text{ °C } 30 \text{ c}, 72 \text{ °C } 80 \text{ c}), 72 \text{ °C } 10 \text{ мин.}$

Продукт ПЦР очищали путем электрофореза в агарозном геле и выделяли с помощью набора DNA Cleanup (Евроген, Россия). Выделенный продукт встраивали в вектор lego-iG2 (Addgene, США) последовательно по сайтам рестрикции XmaI и SphI. Карта лентивирусного вектора переноса для доставки *TP53* дикого типа приведена на рисунке 6. После сборки генетической конструкции была проведена трансформация компетентных бактерий *E. coli* XL-1 Blue, наработка и выделение плазмидной ДНК из нескольких культур. Встраивание целевой конструкции верифицировали секвенированием по Сэнгеру.



Рисунок 6 – Карта вектора переноса для доставки *TP53* дикого типа. Источник: SnapGene software (www.snapgene.com)

Для сборки трансдуцирующих частиц клетки НЕК293Т трансфицировали 2 мкг вектора, несущего последовательность *TP53*дикого типа и смеси векторов для сборки лентивирусных частиц (REV, VSV-G), с помощью липофектамина-3000 (Themo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Спустя 48 часов культивирования собирали кондиционную среду, добавляли протамин сульфат (5 мкг/мл) и вносили среду к клеткам HaCaT с последующей инкубацией в течение 60 минут. По завершении инкубации клетки 72 замещали свежую среду культивирования. Спустя часа среду на стандартных условиях, были собирали культивирования В клетки трипсинизацией для сортировки по уровню свечения зеленого флуоресцентного белка GFP. Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи

клеточного сортера BD FACSMelody[™] Cell Sorter (BD Biosciences, США). Для детекции белка p53 использовали моноклональные антитела к p53 (Abcam, Великобритания). В качестве контроля использовали линии HaCaT дикого типа и клетки с нокаутом p53 (*TP53* KO HaCaT).

2.15 Статистическая обработка данных

Статистический анализ данных проводили в программе Prism 9.3.1 (GraphPad). Результаты всех измерений представлены в виде среднего ± SEM (Standard error of the mean – стандартная ошибка среднего). Для статистического анализа использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA – Analysis Of Variance) с последующим тестом множественного сравнения по методу Шидака-Холма. Различия считали достоверными при уровне значимости р <0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Нокаут ТР53 в клетках НаСаТ

В результате работы впервые была получена линия кератиноцитов HaCaT с нокаутом *TP53*. Для инактивации гена *TP53* клетки HaCaT использовали систему CRISPR/Cas9^{D10A} в сочетании с парными направляющими PHK. Клетки трансфицировали конструкциями, кодирующими направляющие PHK, нуклеазу Cas9^{D10A} и кассету, кодирующую зеленый флуоресцентный белок (GFP). Клетки с наиболее высоким уровнем экспрессии GFP были отсортированы для последующего клонального анализа.

Первичную оценку экспрессии р53 проводили методом иммуноблоттинга, по результатам которого были определены клоны, не экспрессирующие целевой белок. Детекцию р53 методом иммуноблоттинга и ИФА повторяли на протяжение нескольких пассажей (рисунок 7А,Б), после чего из выбранных линий выделяли геномную ДНК для амплификации целевого фрагмента TP53 и анализа его последовательности секвенированием по Сэнгеру. Хроматограммы, полученные в результате секвенирования, анализировали с помощью ПО TIDE [142]. Результаты анализа последовательности ТР53 выявил множественные инсерции и делеции в области предполагаемого редактирования. По результатам анализа был выбран клон с наибольшей эффективностью редактирования: 23% аллелей имели делецию 10 нуклеотидов, 27,5% аллелей имели инсерцию 13 нуклеотидов, 26,3% аллелей - 18 нуклеотидов (рисунок 7В). Следует отметить, что ресурс TIDE не позволяет оценивать изменения в анализируемых последовательностях, превышающие 30 пар основания. Кроме того, значимым признаком является полное отсутствие аллелей, последовательность которых полностью идентична последовательности дикого типа (исходной линии).



Рисунок 7 – Верификация нокаута *ТР53* в клетках НаСаТ. (А) Детектирование p53 методом иммуноблоттинга в клетках исходной линии и после проведения pедактирования. GAPDH использовали в качестве контроля загрузки (Б)
Детектирование тотального и фосфорилированного p53 в клетках НаСаТ до и после pедактирования. Данные приведены как среднее значение ± SEM (В)
Анализ последовательности гена *ТР53* после pедактирования с помощью ПО TIDE

Анализ последовательности *TP53* в полученной линии подтвердил редактирование в целевом участке гена. Полное отсутствие p53 на уровне белка было подтверждено методами ИФА и иммуноблоттинга. Согласно результатам комплексной оценки эффективности редактирования в результате работ впервые была получена линия кератиноцитов HaCaT со стабильным нокаутом *TP53*. Полученные результаты также свидетельствуют о том, что система

55

CRISPR/Cas9^{D10A} может быть успешно использована для нокаута целевых генов в анеуплоидных клеточных линиях.

3.2 Молекулярное профилирование клеток НаСаТ и ТР53 КО НаСаТ

3.2.1 Транскриптомный анализ

Транскрипционный фактор р53 имеет множество элементов отклика в геноме человека и более 350 генов-мишеней [143]. Мутации приобретения функции (gain-of-function, GOF) значительно расширили диапазон транскрипционной активности p53 в клетках HaCaT. Так, в геноме HaCaT было идентифицировано более 7000 тысяч элементов отклика p53 [15]. Мутации в p53, влекущие потерю каноничных функций белка дикого типа, являются важным этапом в прогрессии опухоли, поэтому исследование особенностей мутантных форм р53 и их роли в различных физиологических процессах в клетках является актуальной задачей. Особенный интерес вызывает транскрипционная активность мутантных форм р53 и влияние полной инактивации р53 на экспрессию его подконтрольных генов. Эффективным инструментом для изучения экспрессии генов является транскриптомный анализ. RNA-Seq – современный метод секвенирования, который позволяет точно идентифицировать гены и уровни их экспрессии. В рамках текущего этапа работ было выполнено транскриптомное профилирование клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом *TP53*.

В результате сравнительного транскприптомного анализа всего было идентифицировано 12825 и 12368 генов в клетках WT и *TP53* KO HaCaT, соответственно. Анализ дифференциальной экспрессии выявил 395 генов с дифференциальной экспрессией между линиями (рисунок 8), причем экспрессия 86 генов была увеличена в клетках *TP53* KO HaCaT по сравнению с клетками дикого типа, а 309 – снижена. Гены с дифференциальной экспрессией были отфильтрованы по критерию FDR <0,05 и отсортированы в порядке снижения диапазона изменения (FC).



total = 19193 variables

Рисунок 8 – Диаграмма (volcano plot), демонстрирующая гены с дифференциальной экспрессией между линиями (WT и *TP53* KO HaCaT)

Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA) был выполнен для идентификации путей и процессов, затронутых в результате нокаута ТР53 (рисунок 9). Согласно результатам GSEA, нокаут TP53 привел к значительным изменениям в таких путях как процессинг PHK ('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 р53 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 HaCaT данными недавнего исследования, согласно которым, клетки

представляют собой удобную модель для исследования формирования и функций первичных ресничек. Кроме того, нарушения в формировании ресничек характерны для случае атопического дерматита и псориаза [144].



Рисунок 9 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности: идентификация и процессов, затронутых в результате нокаута *TP53*

Среди генов с измененным уровнем экспрессии, наибольший диапазон изменения наблюдался для гена *SLCO1B3* (log₂FC = 6,49). Данный ген кодирует

трансмембранный рецептор Н, который обеспечивает внутриклеточный транспорт широкого спектра органических анионов [145]. Высокий диапазон изменения наблюдался для гена LCP-1 (log₂FC = 5,57), кодирующего пластин-2. Данный белок активирует миграцию и инвазию, а его повышенная экспрессия коррелирует с неблагоприятным прогнозом в случаях плоскоклеточной карциномы легкого [146]. Стоит отметить, что высокая экспрессия LCP-1 характеризует клетки линии А431 (меланома) и входит в список из 10 генов с наиболее выраженной дифференциальной экспрессией между клетками НаСаТ и А431 [147]. В клетках с нокаутом ТР53 была значительно увеличена экспрессия ISM1 (log₂FC = 3,97). Данный ген участвует в регуляции иммунного ответа и негативной регуляции ангиогенеза. Нокаут *ТР53* приводил к увеличению экспрессии генов, кодирующих некоторые цитокины и их рецепторы. Так, в клетках *TP53* KO была заметно увеличена экспрессия *IL1A* ($\log_2 FC = 3.14$) и *IL1B* $(\log_2 FC = 2.4)$. Кроме того, экспрессия *IL1R1* также была значительно выше в клетках с нокаутом TP53 (log₂FC = 4.55). В клетках с нокаутом TP53 была заметно увеличена экспрессия CD274 (log₂FC= 3.10). Этот ген кодирует белок PD-L1, уровень которого часто повышен в опухолях, что приводит к уклонению опухолевых клеток от иммунного ответа [148]. Кроме того, PD-L1 является важным медиатором ЭМП [149]. Заметно была увеличена экспрессия гена AREG $(\log_2 FC = 2.03)$. Ген AREG связан с псориазоподобным фенотипом кожи [150], индуцирует ЭМП в клетках рака поджелудочной железы через EGFR/ERK/NFkB [151]. Белок, кодируемый этим геном, является аутокринным фактором роста, а также митогеном для астроцитов, шванновских клеток и фибробластов. Белок взаимодействует с рецептором EGF/TGF-α, способствуя росту нормальных эпителиальных клеток, и ингибирует рост некоторых агрессивных клеточных линий карциномы [151]. В результате нокаута также возросла экспрессия DLC-1 (log₂FC= 2,93). Ген DLC-1 кодирует GTPase-activating protein (GAP) [152]. Белки семейства GAP вовлечены в сигнальные пути, которые регулируют клеточные процессы, участвующие в изменениях цитоскелета. Ген DLC-1 действует как генсупрессор опухоли при ряде распространенных видов рака, включая рак простаты, легких, колоректальный рак и рак молочной железы [153]. In vivo DLC-1 функционирует как активатор фосфолипазы PLCD1 [154]. Активный белок DLC1 увеличивает скорость миграции клеток, но снижает их направленность [155]. Помимо DLC-1 в клетках с нокаутом TP53 была повышена экспрессия *LPXN* ($\log_2 FC = 2,10$). Кодируемый данным геном белок леупаксин способствует регуляции клеточной адгезии и миграции клеток [156]. Экспрессия гена AREG была также заметно увеличена ($\log_2 FC = 2,03$). В клетках *TP53* KO была заметно увеличена экспрессия *MMP13* (log₂FC= 2,57). Данный ген кодирует члена семейства пептидаз М10 матриксных металлопротеиназ (ММП). Белки этого семейства участвуют в разрушении внеклеточного матрикса в нормальных физиологических процессах, а также в патологических процессах, включая метастазирование [157, 158]. Помимо ММР13, в клетках с нокаутом ТР53 была заметно снижена экспрессия TIMP2 (log₂FC = -2,90), тканевого ингибитора Помимо ингибирующей металлопротеиназ. роли В отношении металлопротеиназ, кодируемый белок играет уникальную роль среди членов семейства ТІМР, поскольку он способен напрямую подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток.

В числе генов, экспрессия которых была заметно снижена в результате нокаута TP53, можно выделить ген MAGED1 ($\log_2 FC = -6,93$). MAGED1 экспрессируется повсеместно и играет роль в противоопухолевом генезе в различных типах клеток. Репрессия *MAGED1* характерна для опухолевых клеток [159]. Аналогичным образом, в опухолевых клетках заметно снижена экспрессия FBP1, который действует как фермент, ограничивающий скорость глюконеогенеза. В клетках с нокаутом *TP53* экспрессия *FBP1* также была заметно снижена ($\log_2 FC = -5,32$). Примечательно, что при раке желудка снижение уровня этого гена приводит к активации ЭМП [160]. Также в клетках с нокаутом была снижена экспрессия гена *CD9* ($\log_2 FC = -1, 26$), который играет важную роль в подавлении подвижности раковых клеток и метастазировании. Белок.

кодируемый *CD9*, участвует во многих клеточных процессах, включая дифференцировку, адгезию и передачу сигналов [161].

Значимое снижение экспрессии было характерно для генов, кодирующие многие цитокератины: *KRT4*, *KRT13*, *KRT15*, *KRT6B*, *KRT16* ($\log_2FC = -6,07, -2,47, -4,12, -3,11, -2,75$, соответственно). Примечательно, что снижение экспрессии *KRT13* наблюдается при TGF-β1-индуцированного ЭМП [162]. В то же время, *KRT6B* и *KRT16* часто рассматривают в качестве молекул, сигнализирующих о стрессе и инициации адаптивного ответа в кератиноцитах [163, 164]. В клетках с нокаутом была заметно снижена экспрессия ключевых генов эпидермальной дифференцировки – *IVL* и *KRT10* ($\log_2FC = -1,25$ и -3,87, соответственно) [13, 22].

Анализ обогащения также выявил сигнальные пути, наиболее выраженно затронутые в результате нокаута ТР53 (рисунок 10). В нокаутных клетках была наиболее выражена активация сигнальных путей MAPK, EGFR, NFkB, PI3K, TNFa, Wnt. Примечательно, что гиперактивация путей PI3K/AKT и EGFR характерная для некоторых типов рака человека, включая меланому, ВСС и SCC [165]. Гиперактивация пути МАРК является важной причиной многих видов рака у человека. В коже Wnt активируется при ранении и участвует на каждом последующем этапе процесса заживления [166]. Неправильная регуляция сигнальных каскадов Wnt не только приводит к возникновению, прогрессии и инвазии опухоли, но и поддерживает раковые стволовые клетки, которые способствуют рецидиву опухоли [167]. Сигнальный путь NFkB играет ключевую [168] роль В поддержании гомеостаза кожи И является главным транскрипционным регулятором воспаления и иммунитета [169], который также становится ключевым положительным регулятором экспрессии PD-L1 при раке [170, 171]. NFкB напрямую индуцирует транскрипцию гена CD274 путем связывания с его промотором, а также может регулировать PD-L1 на посттранскрипционном уровне [170]. Примечательно, что экспрессия CD274 была также значительно увеличена в клетках с нокаутом ($log_2FC=3.10$).



Рисунок 10 – Активность сигнальных путей, включающих гены с дифференциальной экспрессией между линиями WT и *TP53* HaCaT. NES normalized enrichment score

Длинные некодирующие PHK (lncRNA) играют важнейшую регуляторную роль во многих биологических процессах, включая морфогенез, дифференцировку и иммунный ответ, апоптоз, пролиферацию, метаболизм, миграцию и другие процессы [172]. Кроме того, недавние исследования демонстрируют, что многие lncRNA играют важную роль в патогенезе рака кожи [173]. Принимая во внимание тот факт, что многие некодирующие PHK 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 PHK (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 (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Диаграмма (volcano plot), демонстрирующая lncRNA с дифференциальной экспрессией между линиями (WT и *TP53* KO HaCaT)

Согласно результатам анализа, экспрессия 45 генов была повышена в результате нокаута *TP53*. При этом, для многих транскриптов, экспрессия которых была увеличена в результате нокаута, описаны онкогенные или онкосупрессорные свойства (таблица 3). Кроме того, нами было идентифицировано 60 lncRNA с измененной в результате нокаута *TP53* экспрессией и неизвестными на сегодняшний день функциями.

Таблица 3. Наиболее значимые дифференциально-экспрессирующиеся LncRNA между клетками WT и *TP53* KO HaCaT.

ГЕН	LOG ₂ FC	АССОЦИАЦИЯ С ЗАБОЛЕВАНИЕМ	ИЗВЕСТНЫЕ ФУНКЦИИ	ССЫЛКИ
ESRG	3,79	Колоректальный рак	Поддержание стволовости и плюрипотентности, супрессия p53	[174]
LNCOG	3,51	Карцинома головы и шеи	Мастер-регулятор ЭМП	[172]
MIR155HG	2,847	Рак шейки матки, рак желудка, меланома	Ингибирует апоптоз	[175–177]
LINC01303	2,39	Рак гортани, крупноклеточная лимфома	Способствует миграции и инвазии посредством регуляции miR-200c/TIMP2, модулирует ЭМП	[178, 179]
KILH	2,07	Гепатоцеллюлярная карцинома	Позитивный регулятор Notch1	[180]
LINC02474	1,86	Колоректальный рак	Ингибирует апоптоз; усиливает метастазирование	[181]
LINC02057	1,77	Плоскоклеточный рак пищевода	-	[182]
MSC-AS1	1,68	Колоректальный рак, карцинома желудка	Стимулирует пролиферацию, усиливает гликолиз	[183]
MIR100HG	1,50	Остеосаркома, рак желудка, колоректальный рак и др.	Регулирует пролиферацию клеток, апоптоз, переход клеточного цикла и дифференцировку клеток.	[184]
MIR205HG	1,33	Меланома, плоскоклеточная карцинома пищевода	Регулирует патогенез меланомы посредством miR-299-3p/VEGFA	[185, 186]
MIR17HG	1,09	Колоректальный рак, остеосаркома	Позитивный регулятор Wnt/β; участвует в регуляции гликолиза	[187, 188]

Ген	Log ₂ FC	Ассоциация с заболеванием	Известные функции	Ссылки
LNCTAM34A (GUARDIN)	-1,89	Рак молочной железы	p53-регулируемая lncRNA, необходима для поддержания стабильности генома, снижает клеточное старение	[189]
LINC01679	-2,38	Рак предстательной железы	Ингибирует прогрессию рака предстательной железы посредством miR- 3150a-3p/SLC17A9	[190]

Таблица 3. Наиболее значимые дифференциально-экспрессирующиеся LncRNA между клетками WT и *TP53* KO HaCaT (продолжение).

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 (https://bio.liclab.net/LncSEAv2/index.php). Функциональная аннотация транскриптов выявила, что lncRNA с дифференциальной экспрессией (рисунок 12) 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 12 – Функциональная аннотация lncRNA с увеличенной в результате нокаута *TP53* экспрессией. FDR –ожидаемая доля ложных отклонений

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.

3.2.2 Сравнительный протеомный анализ

Панорамный протеомный анализ был выполнен для исследования влияния нокаута *TP53* в клетках HaCaT. В связи с тем, что свойства кератиноцитов в значительной степени зависят от функционального статуса клеток и, в частности, от конфлюентности при культивировании, протеомное исследование было выполнено на клетках, собранных по достижению 70% конфлюентности (субконфлюент), а также на клетках после индукции программы

66

дифференцировки путем продолжительного (72 часа) культивирования после достижения 100% конфлюентности. Определение взаимного влияния мутаций и конфлюентности определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA), согласно которому, 511 из 2644 идентифицированных белков дифференциально экспрессировались между линиями. Анализ обогащения по функциям в терминах антологии генов (Gene Ontology, GO) (рисунок 13) выявил, что значительная часть белков с измененным уровнем экспрессии была ассоциирована с такими процессами, как метаболизм (metabolic processes, GO:0044237) и организация и биогенез клеточных компонентов (cellular component organization or biogenesis, GO: 0071840).



Рисунок 13 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности Gene Ontology (GO) белков со значимым изменением по результатам двухфакторного дисперсионного анализа (р <0,05). Образцы были классифицированы по наличию мутации и конфлюентности

Для более детального изучения влияния нокаута TP53 был выполнен анализ белков с дифференциальной экспрессией между клетками WT и TP53 KO HaCaT конфлюентности при культивировании В средней И после культивирования в полной конфлюентности в течение 72 часов. В условиях субконфлюента 403 белка дифференциально экспрессировались между линиями (log₂FC> 1). Экспрессия 15 белков была снижена в клетках HaCaT в результате нокаута TP53, а 388 белков – повышена. С помощью GSEA было установлено, что ключевые изменения на протеомном уровне были ассоциированы с таким процессами, как трансляция ('translation', 'cytoplasmic translation'), биосинтезом и метаболизмом белков ('peptide biosynthetic process', 'peptide metabolic process') и другими процессами (рисунок 14). 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. Согласно результатам GSEA, к данному термину были относятся 49 белков, среди которых интегрин-α2 (ITGA2), интегрин-α6 (ITGA6), зиксин (ZYX) и другие. Фокальные контакты представляют собой крупные белковые комплексы, которые соединяют цитоскелет клетки с ВКМ посредством интегринов. Интегрины — это белки клеточной адгезии с α- и βтрансмембранными гетеродимерами, которые играют важную роль в передаче сигналов от клеточной мембраны внутрь клетки. Раковые клетки участвуют в различных типах направленной миграции, а восприятие окружающей среды раковыми клетками позволяет им интерпретировать различные сигналы, которые передаются с помощью фокальных контактов [191]. Кроме того, белки фокальных контактов вовлечены в регуляцию миграции и клеточной адгезии мезенхимальных клеток, а увеличение экспрессии данных белков характерно для клеток в процессе ЭМП. В частности, увеличение белков фокальных контактов отмечалось ранее при индукции ЭМП в клетках HaCaT при воздействии TGF-β1 [192].

Biological processes



Cell components



Рисунок 14 – Анализ обогащения по функциональной принадлежности белков с дифференциальной экспрессией в клетках WT и *TP53* KO HaCaT

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

69

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 [193]. Согласно результатам протеомного анализа, нокаут *TP53* приводил к увеличению экспрессии RAB1B (log₂FC = 2,04), RAB5C (log₂FC = 1,47), RAB7A (log₂FC = 2,22), RAB11A (log₂FC = 1,72), RAB14 (log₂FC = 1,54).

Кроме того, протеомный анализ выявил заметное снижение таких белков как кератин 4 и 15 ($\log_2 FC = -2,61$ и -1,73, соответственно), инволюкрин ($\log_2 FC = -1,69$), что также подтверждалось и в транскриптомном анализе. Однако, для белков со сниженной экспрессией не была получена функциональная аннотация в терминах Gene Ontology.

Согласно результатам комплексного молекулярного профилирования исследуемых клеточных линий, инактивация p53 приводила к значительным изменениям на уровне белка и мРНК. Наиболее значимые различия на уровне протеома включали обогащение белков, связанных с метаболизмом и биосинтезом (трансляцией), увеличение экспрессии белков клеточной адгезии и адгезии к субстрату, фокальной адгезии и активацию экспрессии Rab-TГФаз.

3.3 Нокаут ТР53 в клетках НаСаТ приводит к реализации про-онкогенных программ

3.3.1 Клетки НаСаТ, дефицитные по p53, проявляют признаки ЭМП

Транскриптомное профилирование выявило, что нокаут *TP53* приводит к значительным изменениям на уровне экспрессии мРНК. Согласно полученным результатам, клетки *TP53* КО НаСаТ демонстрируют определенные признаки ЭМП. Для подтверждения данной гипотезы была выполнена оценка уровня экспрессии ЭМП-сигнатурных генов («general EMT score») (рисунок 15А). Согласно полученным данным, нокаут *TP53* приводил к смещению транскриптомного профиля клеток НаСаТ 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) [139] методом проточной цитометрии (рисунок 15Б). Снижение экспрессии Е-кадгерина и увеличение экспрессии N-кадгерина в клетках *TP53* КО НаСаТ свидетельствует о смещении фенотипа клеток в сторону мезенхимального.



Рисунок 15 – Нокаут *TP53* приводит к проявлению признаков ЭМП в клетках HaCaT (A) – определение EMT-score (-1 = полностью эпителиальный фенотип, +1 = полностью мезенхимальный фенотип). Данные приведены как среднее значение ± SEM

3.3.2 Нокаут ТР53 приводит к увеличению экспрессии PD-L1

Транскриптомное профилирование выявило увеличение экспрессии *CD274* (PD-L1) в клетках *TP53* KO HaCaT, что вызвало особенный интерес в контексте реализации программы ЭМП. Лиганды запрограммированной клеточной гибели

(PD-L) 1 и 2 экспрессируются как на опухолевых, так и на иммунных клетках. В нормальных кератиноцитах человека PD-L1 экспрессируется слабо, однако, оверэкспрессия PD-L1 была зарегистрирована в нескольких опухолях, включая плоскоклеточную карциному (SCC) [194, 195]. В случаях меланомы экспрессия PD-L1 чаще всего наблюдается на злокачественных меланоцитах и иммунных клетках на границе нормальной ткани и опухоли [196]. Кроме того, PD-L1 является важным модулятором ЭМП и перестройки метаболизма в опухолевых клетках [149, 197]. Оверэкспрессия PD-L1 в опухолевых клетках является признаком уклонения от иммунитета. Разработка терапевтических антител к PD-1 и его лиганду (PD-L1) произвела революцию в терапии рака. Данные АТ блокируют взаимодействие PD-1 и PD-L1 и препятствуют уклонению опухоли от иммунного ответа. Эта фармакологическая блокада усиливает противораковую активность Т-клеток и вызывает клинические реакции при различных видах рака. Данные транскриптомного анализа были верифицированы методом проточной цитометрии (рисунок 16). Анализ уровня экспрессии PD-L1 выявил значительно увеличение (более чем в 5 раз) уровня PD-L1 на поверхности клеток *ТР53* КО по сравнению с клетками дикого типа.



Рисунок 16 – Определение PD-L1 в клетках HaCaT и *TP53* KO HaCaT. SI – stain index. ***p value = 0,00002. Данные приведены как среднее значение ± SEM
3.5 Нокаут ТР53 приводит к увеличению скорости миграции клеток НаСаТ

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 был выполнен тест scratch-wound assay (scratch-тест). Согласно результатам скретч-теста, клетки с нокаутом ТР53 заполняли повреждение быстрее, чем клетки дикого типа (рисунок 17А,Б). Так, время заполнения дефекта для клеток WT и *TP53* KO составило 18 - 22 часа и 12 - 14 часов, соответственно. Заполнение дефекта (повреждения) может достигаться не только за счет миграции, но и за счет пролиферации клеток. Согласно данным определения скорости пролиферации в клетках WT и TP53 КО HaCaT, нокаут TP53 приводит к снижению скорости пролиферации клеток. Однако, с целью полного исключения влияния пролиферации на заполнение повреждения был выполнен повторный эксперимент, в рамках которого клетки обрабатывали митомицином С, как было описано в более ранних исследованиях [198, 199]. Как и в тесте с необработанными клетками, в условиях предобработки митомицином С клетки с нокаутом ТР53 заполняли повреждение быстрее (за 16-18 часов), чем клетки быстрого типа, заполнение дефекта которыми занимало более 24 часов. Заполнение дефекта в необработанными клетками WT и TP53 KO и клетками, обработанными митомицином С, достигалось за счет коллективной миграции клеток (миграция фронтом за лидирующими клетками). Колонизации зоны дефекта отдельными клетками вне фронта миграции не наблюдалось.

Время после нанесения повреждения (ч)



Рисунок 17 – Влияние нокаута *TP53* на скорость миграции и пролиферации в клетках HaCaT. (A) 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 ± SEM

В недавнем исследовании была исследована роль длинной некодирующей PHK PRECSIT (p53 regulated carcinoma-associated STAT3activating long intergenic non-protein coding transcript) в поддержании инвазии клеток плоскоклеточной карциномы кожи (cSCC). PRECSIT регулирует экспрессию MMP-1 и MMP-13 посредством STAT3, что, в свою очередь, способствует миграции и инвазии клеток [125]. Так как транскриптомный анализ

74

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 17В) 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.

Результаты определения миграционной активности задают предпосылки к новым применениям полученной линии. Нарушение заживления ран является распространенным осложнением у пациентов с диабетом, а патогенез диабетических ран остается неясным. При гипергликемии кератиноциты проявляют ограниченную способность к миграции, что приводит к плохой реэпителизации и закрытию раны [200]. Ранее на мышиной модели было показано, что инактивация p53 с помощью siRNA приводила к увеличению скорости закрытия ран [201], что хорошо соотносится с приведенными в настоящей работе результатами.

Согласно полученным нами данным, нокаут *TP53* в клетках HaCaT приводит к проявлению признаков ЭМП. Увеличение скорости миграции в клетках с нокаутом *TP53* хорошо соотносится с этими результатами, так как повышенная скорость миграции также является важными признаком ЭМП. Кроме того, инактивация p53 приводила к проявлению и других свойств, характерных для опухолевых клеток, таких как высокая экспрессия PD-L1. Онкосупрессорные функции p53 проявляются в том числе в репрессии программы ЭМП. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что несмотря на наличие мутаций, p53 в клетках HaCaT как минимум частично сохраняет свои онкосупрессорные функции. Хотя традиционно кератиноциты HaCaT рассматривают как нормальные кератиноциты, клетки данной линии

демонстрируют потенциал к трансформации, который, вероятно, сдерживается мутантным p53.

3.4 р53^{R282Q/H179Y} ассоциирован с повышенной пролиферативной активностью

Центральная биологическая роль p53 заключается в элиминации клеток, накопивших критическое количество изменений в ДНК, для поддержания геномного гомеостаза. Реализация данной функции р53 осуществляется главным образом посредством контроля клеточного цикла и регуляции апоптоза. В более ранних исследованиях было показано, что мутантный р53 ассоциирован с повышенной скоростью пролиферации в клетках HaCaT, так как нокдаун TP53 приводил к снижению пролиферативной активности [15]. В рамках настоящего исследование было оценено влияние нокаута *ТР53* на скорость пролиферации клеток HaCaT путем анализа скорости разбавления флуоресцентной метки CvtotraceTM Red (рисунок 18A). a также помощью окрашивания С кристаллическим фиолетовым (рисунок 18Б,В). Снижение интенсивности флуоресценции (разбавление метки) пропорционально количеству клеточных делений. Таким образом, полученные результаты полностью соотносятся с литературы подтверждают, данными И что неканонические свойства р53^{R282Q/H179Y} связаны с повышенной пролиферативной активностью и скоростью роста.



Рисунок 18 – Влияние нокаута *TP53* на скорость пролиферации клеток НаСаТ (А) Определение скорости пролиферации путем анализа скорости разбавления флуоресцентной метки CytotraceTM Red. ΔМИФ –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 ΔМИФ ± SEM (Б) определение скорости пролиферации с помощью кристаллического фиолетового спустя 48 часов после засева клеток. Данные приведены как среднее значение ОП ± SEM (В) Фотографии культур WT и *TP53* KO HaCaT, окрашенных кристаллическим фиолетовым

77

3.5 Нокаут ТР53 приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки

Участие белка p53 в регуляции эпидермальной дифференцировки изучено недостаточно. В то же время, мы наблюдали значительно 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 [13]. Анализ экспрессии мРНК (рисунок 19А) 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*).

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 НаСаТ обычно не образуют стратифицированный полноценный эпидермис, а лишь несколько неравномерных атипичной экспрессией слоев клеток с маркеров дифференцировки, часто не ассоциированной с конкретным слоем 3D модели [202]. При культивировании на границе раздела фаз экспрессия кератина 1 (рисунок 19Б) была значительно ниже в клетках ТР53 КО НаСаТ по сравнению с клетками дикого типа, что хорошо соотносится с результатами ОТ-ПЦР-РВ и также подтверждает, что нокаут *ТР53* 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 [203]. Вероятно, несмотря на наличие

мутаций, p53 сохраняет функциональную активность, необходимую для реализации программы эпидермальной дифференцировки.



Время культивирования (сутки)

Рисунок 19 – Нокаут *TP53* приводит к репрессии программы эпидермальной дифференцировки в клетках HaCaT. (А) ИЦХ: окрашивание кератина 1 (К1) в эпидермальных эквивалентах, полученных на основе клеток WT и *TP53* KO НаСаТ путем продолжительного (14 суток) культивирования на границе раздела

фаз жидкость-воздух. (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). **** р <0,0001; *** р <0,001;

** p <0,005. Данные приведены как среднее значение ± SEM

3.5 Нокаут ТР53 усиливает индукцию апоптоза в клетках НаСаТ

Наряду с контролем клеточного цикла, регуляция программируемой клеточной гибели также является ключевой функцией p53 [47]. Мутации в *TP53*, в результате которых р53 теряет способность к индукции апоптоза, могут существенно влиять на прогрессию опухоли [70]. В то же время, влияние *ТР53* в клетках НаСаТ на регуляцию мутаций В 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 нокдаун p53 приводит к снижению уровня апоптоза в клетках HaCaT после воздействия UVB [15]. В другом исследовании были опубликованы противоположные данные [122]. Авторы которые продемонстрировали, что мутантный р53 в HaCaT кооперирует с NF-kB и индуцирует IL-1/TNF-опосредованный апоптоз [122]. Авторы находят изящное объяснение данному явлению: так как 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 р53 в HaCaT с более высокой устойчивостью клеток при химической индукции апоптоза такими соединениями как PhIP [204] и камптотецин [205].

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 [206]. Детектирование апоптоза (Рисунок 20) осуществляли с помощью окрашивания annexin V и PI спустя 24 часа экспозиции с СССР (30 и 50 нМ).



Рисунок 20 – Детектирование апоптоза в клетках WT и *TP53 KO* HaCaT при воздействии СССР (A) 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 ± SEM. **p <0,1, ***p <0,001, ****p <0,0001

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* КО НаСаТ апоптоз детектировался в значительной доле клеток при более низкой концентрации СССР. Так, при воздействии 30 нМ СССР в клетках дикого типа лишь $3,07\pm0,24\%$ находились в состоянии раннего апоптоза, в то время как в клетках с нокаутом детектировалось $16,06\pm1,10\%$ клеток в состоянии апоптоза. При увеличении концентрации до 50 нМ, число клеток дикого типа в состоянии апоптоза (Q3-2 + Q3-4) составляло $34,64\pm2,75\%$, в то время как в клетках *TP53* КО НаСаТ этот показатель составлял $47,14\pm1,47\%$. Согласно полученным данным, нокаут *TP53* приводит с сенсибилизации клеток НаСаТ к индукции апоптоза СССР.

Кератиноциты HaCaT являются одной из наиболее предпочтительных альтернатив первичным кератиноцитам В связи с доступностью, стандартизованным ответом на воздействия, не подверженному индивидуальной изменчивости, характерной для клеток, полученных от различных доноров. Линия HaCaT широко используется в качестве модели кератиноцитов человека исследований, токсикологических для В том числе для оценки дерматотоксичности различных соединений [207–209]. B рамках серии была токсикологических тестов выполнена оценка цитотоксичности распространенных детергентов, таких как Triton-X100 и додецилсульфат натрия (ДСН) (данные не приведены). В результате данных исследований не было установлено достоверных различий в снижении жизнеспособности между линиями. Однако, выраженное различие между линиями было выявлено при воздействии на клетки WT и *TP53* КО НаСаТ хлоридом кадмия. Выбор хлорида кадмия в качестве цитотоксического агента был обусловлен тем, что кадмий реализует цитотоксическое действие посредством р53-зависимых механизмов (апоптоз, некроз, аутофагия) [210]. Продолжительное воздействие кадмия на организм человека приводит к ряду негативных последствий, включая интоксикацию и канцерогенез. Кожа, выполняя барьерную функцию, также

82

подвергается токсическому стрессу при взаимодействии с кадмием. Недавние исследования демонстрируют между кадмием связь И различными заболеваниями кожи, включая контактную гиперчувствительность и дерматит [211]. Взаимодействие с кадмием может приводить к нарушению кожного барьера и развитию иммунного ответа и воспаления. Кератиноциты составляют около 95% эпидермиса, чем обусловлен интерес к использованию этих клеток в качестве модели для исследования механизмов токсического действия тяжелых металлов на кожу человека [57]. В недавнем исследовании был подробно описан физиологический ответ клеток HaCaT на воздействие кадмия [209], а в более раннем исследовании было показано, что восстановление р53 дикого типа приводит к увеличению чувствительности к кадмию, а клеточная гибель HaCaT не связана с активацией апоптоза [212]. Вместе с тем, эффект инактивации р53 в клетках HaCaT на чувствительность к кадмий-индуцированной цитотоксичности ранее не был описан.

Нами было показано, что инактивация p53 приводит к увеличению чувствительности клеток HaCaT к токсическому действию кадмия. Влияние кадмия на метаболическую активность клеток оценивали с помощью MTT-теста (Рисунок 21). В обеих линиях наблюдалось дозозависимое снижение уровня метаболической активности. Гибель клеток дикого типа регистрировалась при воздействии кадмия в концентрации 30 мкМ и выше. Однако, клетки с нокаутом *TP53* были более восприимчивы к цитотоксическому действию кадмия. Их гибель регистрировали при воздействии кадмия в концентрации 20 мкМ и выше. Кроме того, в диапазоне концентраций от 20 мкМ и выше жизнеспособность клеток дикого типа была вдвое выше, чем в нокаутных клетках.





Данные приведены как среднее значение \pm SEM. *p <0,05

Результаты МТТ-теста также были подтверждены окрашиванием annexin V/PI (Рисунок 22). Как и в случае с МТТ-тестом, клетки HaCaT дикого типа характеризовались боеле высокой резистентностью к цитотоксическому воздействию кадмия. Так, в клетках дикого типа выраженная гибель клеток была зарегистрирована лишь при воздействии хлорида кадмия в концентрации 30 мкМ, в то время как в клетках с нокаутом гибель клеток детектировалась при воздействии в концентрациях от 10 мкМ и выше.

84



Рисунок 22 – Анализ поглощения пропидий йодида и annexin V клетками WT и *TP53* КО НаСаТ при воздействии разных концентраций кадмия в течение 24 часов. (А) Репрезентативные изображения, полученные в результате анализа методом проточной цитометрии (Б) Процентные соотношения живых клеток (Q3), клеток в состоянии позднего апоптоза/некроза (Q2) и мертвых клеток (Q1). Данные приведены как среднее ± SEM. ** p <0,001, *** p <0,0001; a, b – отличие достоверно по отношению к соответствующему каждой линии контролю (p <0,001)

3.6 Мутантный р53^{R282Q/H179Y} репрессирует экспрессию кератина 17

Кератин 17 не обнаруживается в нормальном эпидермисе, однако, его уровень возрастает при патологиях кожи, поэтому К17 рассматривается как маркер «активации» кератиноцитов. Участие кератина 17 в развитии псориаза было показано еще в 1990 году. Позднее в 1995 г. Leigh и соавторы установили, что К17 присутствует в супрабазальном псориатическом эпидермисе *in vivo* и in *vitro*, что легло в основу дальнейших исследований в этой области. В течение последних десятилетий восприятие креатина 17 в качестве маркера псориаза укрепилось, а также было показано, что его уровень коррелирует со степенью тяжести заболевания [213].

Роль кератина 17 в патогенезе заболевания главным образом реализуется пролиферации путем индукции кератиноцитов И модуляции ИХ иммунокомпетентной активности. Позитивная регуляция пролиферации реализуется путем 14-3-3σ-опосредованной активации mTOR29. Кроме того, кератин 17 усиливает фосфорилирование и ядерную транслокацию STAT3, ключевого регулятора пролиферации псориатических кератиноцитов [214]. И напротив, на мышиной модели было показано, что точечное нанесение siRNA к *KRT17* приводит к снижению пролиферации кератиноцитов [215].

В одном из недавних исследований клетки HaCaT использовались в качестве модельного объекта для подтверждения участия цитокератина 17 в регуляции ответа на повреждение ДНК [216]. Авторы продемонстрировали значительное увеличение кератина 17 в ядре в результате генотоксического стресса. Подобное наблюдение интересно в контексте регуляции экспрессии кератина 17 и роли белка р53 в данном процессе. Цитокератин 17 (*KRT17*) является промежуточным филаментом, слабо представленным в нормальном эпидермисе человека. Его экспрессия регистрируется в случае воспаления кожи, в частности, при псориазе, а также в локусах регенерации кожи после повреждения. В экспериментах с использованием крысиных и мышиных моделей показано, что р53 напрямую связывается с промотором гена *KRT17* и

снижает его экспрессию, в то время как повышение *KRT17* не зависело от p53 [217]. Эти результаты контрастируют с тем фактом, что р53 экспрессируется на высоком уровне в псориатических бляшках, для которых также характерна повышенная экспрессия KRT17 [218]. Кроме того, экспрессия p53 и KRT17 коррелирует в биопсийном материале пациентов с раком молочной железы [219]. Возможно, р53 не активен в этой ситуации и *KRT17* регулируется дополнительными факторами. Нами было показано, что инактивация р53 в клетках НаСаТ приводит к дозозависимому увеличению экспрессии кератина 17 на уровне белка и мРНК (Рисунок 23А). Определение уровня экспрессии *KRT17* показало значительный рост уровня мРНК в клетках с нокаутом р53 при воздействии кадмия. Экспрессия KRT17 в клетках TP53 KO HaCaT возросла в 3,97 и 4,64 раза при воздействии кадмия в концентрации 20 и 30 мкМ соответственно, в то время как экспрессия в клетках дикого типа в аналогичных группах увеличилась в 1,24 и 1,58 раз. Однако, различия между группами в клетках дикого типа не были статистически значимыми. Согласно данным иммуноблоттинга (Рисунок 23Б,В), экспрессия кератина 17 на уровне белка под действием кадмия не изменялась. В клетках с инактивированным р53 уровень кератина 17 напротив, заметно возрастал.

Полученные результаты соотносятся с данными литературы, согласно которым активация экспрессии кератина 17 ассоциирована с повреждением ДНК, воздействие кадмия приводит к генотоксическому стрессу, а p53 является прямым репрессором *KRT17*. Нами было показано, что воздействие кадмия дозозависимо активирует экспрессию цитокератина 17 в клетках HaCaT с инактивированным p53. С одной стороны, это подтверждает обоснованность рассмотрения кератина 17 как «цитокератина стресса». При этом способность кадмия индуцировать экспрессию цитокератина 17 показана нами впервые. С другой стороны, полученные результаты укрепляют немногочисленные подвтерждения взаимосвязи p53 и цитокератина 17.





биологических повторов детектирования кератина 17 методом иммуноблоттинга (денситометрия). *GAPDH* использовался в качестве контроля для нормирования экспрессии. Данные приведены как средние значения ±SEM.

*** p <0,001

Известно, что воздействие кадмия индуцирует генотоксический стресс. Для сравнения ответа на Cd-индуцированную цитотоксичность была проведена оценка уровней повреждения ДНК в клетках WT и TP53 KO HaCaT. Определение уровня генотоксического стресса проводили путем окрашивания гистона Н2А. (Рисунок 24). Согласно полученным средняя данным, интенсивность флуоресценции достоверно возрастала относительно контроля в клетках обеих линий при воздействии кадмия. Хотя достоверных различий между линиями после воздействия кадмия зарегистрировано не было, при этом интенсивность флуоресценции (окрашивание уH2AX) была выше в клетках нокаутом TP53 на уровне тенденции.



Рисунок 24 – Определение уровня генотоксического стресса при воздействии хлоридом кадмия (20 мкМ) на клетки WT и *TP53* КО НаСаТ. Слева – репрезентативные изображения, полученные при флуоресцентном окрашивании гистона H2A. Справа – анализ интенсивности флуоресценции H2A в клетках WT и *TP53* КО НаСаТ.Данные приведены как Данные приведены как средние значения ±SEM. ** p <0,001

Согласно данным литературы, p53 в клетках НаСаТ участвует в индукции UV-индуцированного апоптоза [48]. Однако, согласно полученным в настоящей работе данным, клетки HaCaT, характеризуются более высокой резистентностью к цитотоксическому действию кадмия и СССР по сравнению с клетками *TP53* КО HaCaT. Таким образом, было показано, что инактивация p53 приводит к увеличению чувствительности к апоптозу. Полученные данные свидетельствуют о том, что p53 в клетках HaCaT демонстрирует антиапоптическую активность, а клеточная гибель в выбранных экспериментальных условиях реализуется за счет p53-независимых механизмов. Кроме того, на клетках *TP53* КО HaCaT было впервые показано, что воздействие кадмия индуцирует экспрессию кератина 17. Вероятно, это связано с тем, что кадмий проявляет свою цитотоксичность в том числе за счет повреждения ДНК, а кератин 17 регулирует ответ на генотоксический стресс.

3.7 Восстановление экспрессии p53 дикого типа в клетках ТР53 КО НаСаТ

Для восстановления экспрессии белка p53, клетки TP53 KO HaCaT *TP53* конструкцией, кодирующей трансдуцировали дикого типа. Для амплификации кодирующей последовательности гена дикого типа в качестве РНК, использовали тотальную выделенную матрицы ИЗ первичных кератиноцитов человека. Кодирующая последовательность гена была встроена в лентивирусный вектор переноса, после чего клетки TP53 KO HaCaT трансдуцировали полученным вектором. Спустя 48 часов после трансдукции клетки сортировали по уровню экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP), после чего оценивали уровень экспрессии белка p53 методами иммуноблоттинга (Рисунок 25). Согласно полученным результатам, трансдукция привела к восстановлению экспрессии экзогенного белка р53 дикого типа в клетках *TP53* КО HaCaT. Детекцию методом иммуноблоттинга проверяли на протяжение 5 пассажей. Детальная характеристика линии, экспрессирующей р53 дикого типа, является задачей будущих исследований.



Рисунок 25 – Детектирование p53 методом иммуноблоттинга в клетках HaCaT дикого типа, с нокаутом *TP53* и с восстановленной экспрессией p53 дикого типа

(hTP53 tr.). Actin использовали в качестве контроля загрузки

Однако, известно, что пост-трансляционные модификации играют важнейшую роль в реализации функций p53, что может накладывать существенные ограничения на использованный подход к восстановлению экспрессии p53 дикого типа. В рамках настоящего исследования была разработана методика доставки экзогенного p53 дикого типа с помощью лентивирусного вектора переноса. Детальная характеристика разработанной модельной системы и особенностей ее применения является целью дальнейших исследований.

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, подтвергнутых воздействию 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. Иммортализованные кератиноциты линии HaCaT 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 HaCaT с нокаутом *TP53*. С целью исследования особенностей $p53^{R282Q/H179Y}$ было выполнено молекулярное профилирование клеток HaCaT 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 PHK в клетках HaCaT 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

- Система CRISPR/Cas9^{D10A} с использованием парных направляющих PHK эффективна для получения нокаута *TP53* в анеуплоидной клеточной линии кератиноцитов HaCaT;
- 2) Инактивация р53^{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;
- р53^{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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю, к.х.н. Русанову А.Л. за возможность выполнения исследования и помощь на всех этапах работы. Автор глубоко благодарен Лузгиной Н.Г. за помощь в проведении исследования и подготовке диссертации. Автор благодарит коллег, сотрудников ИБМХ имени В.Н. Ореховича, за поддержку и помощь в планировании и экспериментов. Автор выражает глубокую проведении признательность сотрудникам лаборатории интерактомики протеоформ ИБМХ имени В.Н. Ореховича Поверенной Е.В. и Арзуманян В.А. за их участие и помощь при проведении транскриптомного анализа. Автор выражает благодарность с.н.с. лаборатории клеточной биологии ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина Богомяковой М.Е. за помощь в проведении цитометрического анализа.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Williams A.B., Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. — 2016. — Vol. 6. — No. 5. — P. a026070.

2. Levine A.J. p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery // Nature Reviews Cancer. — 2020. — Vol. 20. — p53. — No. 8. — P. 471-480.

3. Piipponen M., Riihilä P., Nissinen L., Kähäri V.-M. The Role of p53 in Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma // Cancers. — 2021. — Vol. 13. — No. 18. — P. 4507.

4. Leroy B., Anderson M., Soussi T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade // Human Mutation. — 2014. — Vol. 35. — TP53 mutations in human cancer. — No. 6. — P. 672-688.

5. Liu G., Parant J.M., Lang G., Chau P., Chavez-Reyes A., El-Naggar A.K., Multani A., Chang S., Lozano G. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice // Nature Genetics. — 2004. — Vol. 36. — No. 1. — P. 63-68.

6. Timofeev O., Klimovich B., Schneikert J., Wanzel M., Pavlakis E., Noll J., Mutlu S., Elmshäuser S., Nist A., Mernberger M., Lamp B., Wenig U., Brobeil A., Gattenlöhner S., Köhler K., Stiewe T. Residual apoptotic activity of a tumorigenic p53 mutant improves cancer therapy responses // The EMBO journal. — 2019. — Vol. 38. — No. 20. — P. e102096.

7. Liu D.P., Song H., Xu Y. A common gain of function of p53 cancer mutants in inducing genetic instability // Oncogene. — 2010. — Vol. 29. — No. 7. — P. 949-956.

8. Polireddy K., Singh K., Pruski M., Jones N.C., Manisundaram N.V., Ponnela P., Ouellette M., Van Buren G., Younes M., Bynon J.S., Dar W.A., Bailey J.M. Mutant p53R175H promotes cancer initiation in the pancreas by stabilizing HSP70 // Cancer Letters. — 2019. — Vol. 453. — P. 122-130.

9. Wikonkal N.M., Brash D.E. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis // The Journal of Investigative Dermatology. Symposium Proceedings. — 1999. — Vol. 4. — No. 1. — P. 6-10.

10. Rebel H., Kram N., Westerman A., Banus S., van Kranen H.J., de Gruijl F.R. Relationship between UV-induced mutant p53 patches and skin tumours, analysed by mutation spectra and by induction kinetics in various DNA-repair-deficient mice // Carcinogenesis. — 2005. — Vol. 26. — No. 12. — P. 2123-2130.

11. Dumaz N., van Kranen H.J., de Vries A., Berg R.J., Wester P.W., van Kreijl C.F., Sarasin A., Daya-Grosjean L., de Gruijl F.R. The role of UV-B light in skin carcinogenesis through the analysis of p53 mutations in squamous cell carcinomas of hairless mice // Carcinogenesis. — 1997. — Vol. 18. — No. 5. — P. 897-904.

12. Benjamin C.L., Ananthaswamy H.N. p53 and the Pathogenesis of Skin Cancer // Toxicology and applied pharmacology. — 2007. — Vol. 224. — No. 3. — P. 241-248.

13. Colombo I., Sangiovanni E., Maggio R., Mattozzi C., Zava S., Corbett Y., Fumagalli M., Carlino C., Corsetto P.A., Scaccabarozzi D., Calvieri S., Gismondi A., Taramelli D., Dell'Agli M. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes // Mediators of Inflammation. — 2017. — Vol. 2017. — P. 7435621.

14. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. // The Journal of Cell Biology. — 1988. — Vol. 106. — No. 3. — P. 761-771.

15. Martynova E., Pozzi S., Basile V., Dolfini D., Zambelli F., Imbriano C., Pavesi G., Mantovani R. Gain-of-function p53 mutants have widespread genomic locations partially overlapping with p63 // Oncotarget. — 2012. — Vol. 3. — No. 2. — P. 132-143.

16. Gantwerker E.A., Hom D.B. Skin: histology and physiology of wound healing // Facial Plastic Surgery Clinics of North America. — 2011. — Vol. 19. — Skin. — No. 3. — P. 441-453.

17. Guerrero-Juarez C.F., Plikus M.V. Emerging non-metabolic functions of skin fat // Nature reviews. Endocrinology. — 2018. — Vol. 14. — No. 3. — P. 163-173.

18. Arseni L., Lombardi A., Orioli D. From Structure to Phenotype: Impact of Collagen Alterations on Human Health // International Journal of Molecular Sciences. — 2018. — Vol. 19. — From Structure to Phenotype. — No. 5. — P. E1407.

19. Eckhart L., Zeeuwen P.L.J.M. The skin barrier: Epidermis vs environment // Experimental Dermatology. — 2018. — Vol. 27. — The skin barrier. — No. 8. — P. 805-806.

20. Hasse S., Duong Tran T., Hahn O., Kindler S., Metelmann H.-R., von Woedtke T., Masur K. Induction of proliferation of basal epidermal keratinocytes by cold atmospheric-pressure plasma // Clinical and Experimental Dermatology. — 2016. — Vol. 41. — No. 2. — P. 202-209.

21. Kulukian A., Fuchs E. Spindle orientation and epidermal morphogenesis // Philosophical
Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. — 2013. — Vol. 368. — No. 1629.
— P. 20130016.

22. Sanz-Gómez N., Freije A., Gandarillas A. Keratinocyte Differentiation by Flow Cytometry // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). — 2020. — Vol. 2109. — P. 83-92.

23. Eckhart L., Lippens S., Tschachler E., Declercq W. Cell death by cornification // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. — 2013. — Vol. 1833. — No. 12. — P. 3471-3480.

24. Gutowska-Owsiak, de La Serna, Fritzsche, Naeem, Podobas, M L., H C.-Y., R O., C E., Gs O. Orchestrated control of filaggrin-actin scaffolds underpins cornification // Cell death & disease. — 2018. — Vol. 9. — No. 4.

25. Rogerson C., Bergamaschi D., O'Shaughnessy R.F.L. Uncovering mechanisms of nuclear degradation in keratinocytes: A paradigm for nuclear degradation in other tissues // Nucleus (Austin, Tex.). — 2018. — Vol. 9. — Uncovering mechanisms of nuclear degradation in keratinocytes. — No. 1. — P. 56-64.

26. Čepelak I., Dodig S., Pavić I. Filaggrin and atopic march // Biochemia Medica. — 2019. — Vol. 29. — No. 2. — P. 020501.

27. Menon G.K., Grayson S., Elias P.M. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry // The Journal of Investigative

Dermatology. — 1985. — Vol. 84. — Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis. — No. 6. — P. 508-512.

28. Leinonen P.T., Hägg P.M., Peltonen S., Jouhilahti E.-M., Melkko J., Korkiamäki T., Oikarinen A., Peltonen J. Reevaluation of the Normal Epidermal Calcium Gradient, and Analysis of Calcium Levels and ATP Receptors in Hailey–Hailey and Darier Epidermis // Journal of Investigative Dermatology. — 2009. — Vol. 129. — No. 6. — P. 1379-1387.

29. Choi E.H. Aging of the skin barrier // Clinics in Dermatology. — 2019. — Vol. 37. — No. 4. — P. 336-345.

30. Colombo I., Sangiovanni E., Maggio R., Mattozzi C., Zava S., Corbett Y., Fumagalli M., Carlino C., Corsetto P.A., Scaccabarozzi D., Calvieri S., Gismondi A., Taramelli D., Dell'Agli M. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes // Mediators of Inflammation. — 2017. — Vol. 2017. — P. 7435621.

31. Hennings H., Holbrook K.A. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study // Experimental Cell Research. — 1983. — Vol. 143. — No. 1. — P. 127-142.

32. Papp B., Launay S., Gélébart P., Arbabian A., Enyedi A., Brouland J.-P., Carosella E.D., Adle-Biassette H. Endoplasmic Reticulum Calcium Pumps and Tumor Cell Differentiation // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — Vol. 21. — No. 9. — P. E3351.

33. Smits J.P.H., Dirks R.A.M., Qu J., Oortveld M.A.W., Brinkman A.B., Zeeuwen P.L.J.M., Schalkwijk J., Zhou H., Marks H., van den Bogaard E.H. Terminal keratinocyte differentiation in vitro is associated with a stable DNA methylome // Experimental Dermatology. — 2021. — Vol. 30. — No. 8. — P. 1023-1032.

34. Hancock K., Leigh I.M. Cultured keratinocytes and keratinocyte grafts. // BMJ : British Medical Journal. — 1989. — Vol. 299. — No. 6709. — P. 1179-1180.

35. Movahednia M.M., Kidwai F.K., Jokhun D.S., Squier C.A., Toh W.S., Cao T. Potential applications of keratinocytes derived from human embryonic stem cells // Biotechnology Journal.
2016. Vol. 11. No. 1. P. 58-70.

36. Wang G., Sweren E., Liu H., Wier E., Alphonse M.P., Chen R., Islam N., Li A., Xue Y., Chen J., Park S., Chen Y., Lee S., Wang Y., Wang S., Archer N.K., Andrews W., Kane M.A., Dare E., Reddy S.K., Hu Z., Grice E.A., Miller L.S., Garza L.A. Bacteria induce skin regeneration via IL-1 β signaling // Cell Host & Microbe. — 2021. — Vol. 29. — No. 5. — P. 777-791.e6.

37. Boukamp P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A., Fusenig N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. // The Journal of Cell Biology. — 1988. — Vol. 106. — No. 3. — P. 761-771.

38. AACR Project GENIE Consortium AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium // Cancer Discovery. — 2017. — Vol. 7. — AACR Project GENIE. — No. 8. — P. 818-831.

39. Maturo M.G., Rachakonda S., Heidenreich B., Pellegrini C., Srinivas N., Requena C., Serra-Guillen C., Llombart B., Sanmartin O., Guillen C., Di Nardo L., Peris K., Fargnoli M.C., Nagore E.,

Kumar R. Coding and noncoding somatic mutations in candidate genes in basal cell carcinoma // Scientific Reports. — 2020. — Vol. 10. — P. 8005.

40. Feng R., Yin Y., Wei Y., Li Y., Li L., Zhu R., Yu X., Liu Y., Zhao Y., Liu Z. Mutant p53 activates hnRNPA2B1-AGAP1-mediated exosome formation to promote esophageal squamous cell carcinoma progression // Cancer Letters. — 2023. — Vol. 562. — P. 216154.

41. Alos L., Fuster C., Castillo P., Jares P., Garcia-Herrera A., Marginet M., Agreda F., Arance A., Gonzalvo E., Garcia M., Puig S., Teixido C. TP53 mutation and tumoral PD-L1 expression are associated with depth of invasion in desmoplastic melanomas // Annals of Translational Medicine.
2020. Vol. 8. No. 19. P. 1218-1218.

42. Shi X.-B., Nesslinger N.J., Deitch A.D., Gumerlock P.H., deVere White R.W. Complex functions of mutant p53 alleles from human prostate cancer // The Prostate. — 2002. — Vol. 51. — No. 1. — P. 59-72.

43. Muller P.A.J., Vousden K.H. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities // Cancer Cell. — 2014. — Vol. 25. — Mutant p53 in Cancer. — No. 3. — P. 304-317.

44. Zhang X., Wu Z., Hao Y., Yu T., Li X., Liang Y., Li J., Huang L., Xu Y., Li X., Xu X., Wang W., Xu G., Zhang X., Lv Q., Fang Y., Xu R., Qian W. Aberrantly Activated APOBEC3B Is Associated With Mutant p53-Driven Refractory/Relapsed Diffuse Large B-Cell Lymphoma // Frontiers in Immunology. — 2022. — Vol. 13. — P. 888250.

45. Li Y., Prives C. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function? // Oncogene. — 2007. — Vol. 26. — No. 15. — P. 2220-2225.

46. Xu J., Reumers J., Couceiro J.R., De Smet F., Gallardo R., Rudyak S., Cornelis A., Rozenski J., Zwolinska A., Marine J.-C., Lambrechts D., Suh Y.-A., Rousseau F., Schymkowitz J. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors // Nature Chemical Biology. — 2011. — Vol. 7. — No. 5. — P. 285-295.

47. Wawryk-Gawda E., Chylińska-Wrzos P., Lis-Sochocka M., Chłapek K., Bulak K., Jędrych M., Jodłowska-Jędrych B. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells // Protoplasma. — 2014. — Vol. 251. — No. 3. — P. 525-533.

48. Henseleit U., Zhang J., Wanner R., Haase I., Kolde G., Rosenbach T. Role of p53 in UVB-Induced Apoptosis in Human HaCaT Keratinocytes // Journal of Investigative Dermatology. — 1997. — Vol. 109. — No. 6. — P. 722-727.

49. El-Mahdy M.A., Zhu Q., Wang Q.-E., Wani G., Patnaik S., Zhao Q., Arafa E.-S., Barakat B., Mir S.N., Wani A.A. Naringenin Protects HaCaT Human Keratinocytes Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the Genome // Photochemistry and photobiology. — 2008. — Vol. 84. — No. 2. — P. 307-316.

50. Garach-Jehoshua, Ravid, Liberman, Reichrath, Glaser, Koren Upregulation of the calciumdependent protease, calpain, during keratinocyte differentiation // British Journal of Dermatology. — 1998. — Vol. 139. — No. 6. — P. 950-957.

51. Seo M.-D., Kang T.J., Lee C.H., Lee A.-Y., Noh M. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated

Genes to T Helper Cell Cytokines // Biomolecules & Therapeutics. — 2012. — Vol. 20. — No. 2. — P. 171-176.

52. Rebane A., Zimmermann M., Aab A., Baurecht H., Koreck A., Karelson M., Abram K., Metsalu T., Pihlap M., Meyer N., Fölster-Holst R., Nagy N., Kemeny L., Kingo K., Vilo J., Illig T., Akdis M., Franke A., Novak N., Weidinger S., Akdis C.A. Mechanisms of IFN- γ -induced apoptosis of human skin keratinocytes in patients with atopic dermatitis // Journal of Allergy and Clinical Immunology. — 2012. — Vol. 129. — No. 5. — P. 1297-1306.

53. Noh M., Yeo H., Ko J., Kim H.K., Lee C.-H. MAP17 is associated with the T-helper cell cytokine-induced down-regulation of filaggrin transcription in human keratinocytes // Experimental Dermatology. — 2010. — Vol. 19. — No. 4. — P. 355-362.

54. Guijarro M.V., Leal J.F.M., Fominaya J., Blanco-Aparicio C., Alonso S., Lleonart M., Castellvi J., Ruiz L., Ramon Y Cajal S., Carnero A. MAP17 overexpression is a common characteristic of carcinomas // Carcinogenesis. — 2007. — Vol. 28. — No. 8. — P. 1646-1652.

55. Maas-Szabowski N., Stärker A., Fusenig N.E. Epidermal tissue regeneration and stromal interaction in HaCaT cells is initiated by TGF-alpha // Journal of Cell Science. 2003. — Vol. 116. — No. Pt 14. — P. 2937-2948.

56. Sprenger A., Weber S., Zarai M., Engelke R., Nascimento J.M., Gretzmeier C., Hilpert M., Boerries M., Has C., Busch H., Bruckner-Tuderman L., Dengjel J. Consistency of the Proteome in Primary Human Keratinocytes With Respect to Gender, Age, and Skin Localization // Molecular & Cellular Proteomics : MCP. — 2013. — Vol. 12. — No. 9. — P. 2509-2521.

57. Hirsch T., Rothoeft T., Teig N., Bauer J.W., Pellegrini G., De Rosa L., Scaglione D., Reichelt J., Klausegger A., Kneisz D., Romano O., Secone Seconetti A., Contin R., Enzo E., Jurman I., Carulli S., Jacobsen F., Luecke T., Lehnhardt M., Fischer M., Kueckelhaus M., Quaglino D., Morgante M., Bicciato S., Bondanza S., De Luca M. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells // Nature. — 2017. — Vol. 551. — No. 7680. — P. 327-332.

58. Gutowska-Owsiak D., Ogg G.S. The epidermis as an adjuvant // The Journal of Investigative Dermatology. — 2012. — Vol. 132. — No. 3 Pt 2. — P. 940-948.

59. Muroyama A., Lechler T. Polarity and stratification of the epidermis // Seminars in Cell & Developmental Biology. — 2012. — Vol. 23. — No. 8. — P. 890-896.

60. Rikken G., Niehues H., van den Bogaard E.H. Organotypic 3D Skin Models: Human Epidermal Equivalent Cultures from Primary Keratinocytes and Immortalized Keratinocyte Cell Lines // Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.). — 2020. — Vol. 2154. — Organotypic 3D Skin Models. — P. 45-61.

61. Schürer N., Köhne A., Schliep V., Barlag K., Goerz G. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes // Experimental Dermatology. — 1993. — Vol. 2. — No. 4. — P. 179-185.

62. Zinn M., Aumailley M., Krieg T., Smola H. Expression of laminin 5 by parental and c-Ha-rastransformed HaCaT keratinocytes in organotypic cultures // European Journal of Cell Biology. — 2006. — Vol. 85. — No. 5. — P. 333-343.

63. Natsumi A., Sugawara K., Yasumizu M., Mizukami Y., Sano S., Morita A., Paus R., Tsuruta D. Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions: Is Laminin-511 a

New Player in Psoriasis Pathogenesis? // The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society. — 2018. — Vol. 66. — Re-investigating the Basement Membrane Zone of Psoriatic Epidermal Lesions. — No. 12. — P. 847-862.

64. Kastenhuber E.R., Lowe S.W. Putting p53 in Context // Cell. — 2017. — Vol. 170. — No. 6. — P. 1062-1078.

65. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // Oncogene. — 2017. — Vol. 36. — No. 28. — P. 3943-3956.

66. Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. Surfing the p53 network // Nature. — 2000. — Vol. 408. — No. 6810. — P. 307-310.

67. Tebaldi T., Zaccara S., Alessandrini F., Bisio A., Ciribilli Y., Inga A. Whole-genome cartography of p53 response elements ranked on transactivation potential // BMC genomics. — 2015. — Vol. 16. — P. 464.

68. Antoniades H.N., Galanopoulos T., Neville-Golden J., Kiritsy C.P., Lynch S.E. p53 expression during normal tissue regeneration in response to acute cutaneous injury in swine. // Journal of Clinical Investigation. — 1994. — Vol. 93. — No. 5. — P. 2206-2214.

69. Lozano G. Mouse Models of p53 Functions // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. — 2010. — Vol. 2. — No. 4. — P. a001115.

70. Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? // Cell Death and Differentiation. — 2018. — Vol. 25. — No. 1. — P. 104-113.

71. Bai G.-L., Wang P., Huang X., Wang Z.-Y., Cao D., Liu C., Liu Y.-Y., Li R.-L., Chen A.-J. Rapamycin Protects Skin Fibroblasts From UVA-Induced Photoaging by Inhibition of p53 and Phosphorylated HSP27 // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2021. — Vol. 9. — P. 633331.

72. Ke F., Bouillet P., Kaufmann T., Strasser A., Kerr J., Voss A.K. Consequences of the combined loss of BOK and BAK or BOK and BAX // Cell Death & Disease. — 2013. — Vol. 4. — No. 6. — P. e650.

73. Anbarasan T., Bourdon J.-C. The Emerging Landscape of p53 Isoforms in Physiology, Cancer and Degenerative Diseases // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Vol. 20.
— No. 24. — P. 6257.

74. Chumakov P.M. Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms // Biochemistry. Biokhimiia. — 2007. — Vol. 72. — No. 13. — P. 1399-1421.

75. Knudsen E.S., Knudsen K.E. Tailoring to RB: tumour suppressor status and therapeutic response // Nature Reviews. Cancer. — 2008. — Vol. 8. — Tailoring to RB. — No. 9. — P. 714-724.

76. Freed-Pastor W.A., Prives C. Mutant p53: one name, many proteins // Genes & Development. - 2012. - Vol. 26. - Mutant p53. - No. 12. - P. 1268-1286.

77. Freije A., Molinuevo R., Ceballos L., Cagigas M., Alonso-Lecue P., Rodriguez R., Menendez P., Aberdam D., De Diego E., Gandarillas A. Inactivation of p53 in Human Keratinocytes Leads to

Squamous Differentiation and Shedding via Replication Stress and Mitotic Slippage // Cell Reports. — 2014. — Vol. 9. — No. 4. — P. 1349-1360.

78. Williams A.B., Schumacher B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. — 2016. — Vol. 6. — No. 5. — P. a026070.

79. Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop // Genes & Development. — 1993. — Vol. 7. — No. 7A. — P. 1126-1132.

80. Kruse J.-P., Gu W. Modes of p53 Regulation // Cell. — 2009. — Vol. 137. — No. 4. — P. 609-622.

81. Klein A.M., de Queiroz R.M., Venkatesh D., Prives C. The roles and regulation of MDM2 and MDMX: it is not just about p53 // Genes & Development. — 2021. — Vol. 35. — The roles and regulation of MDM2 and MDMX. — No. 9-10. — P. 575-601.

82. Botchkarev V.A., Flores E.R. p53/p63/p73 in the Epidermis in Health and Disease // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. — 2014. — Vol. 4. — No. 8. — P. a015248.

83. Fujita K. p53 Isoforms in Cellular Senescence- and Ageing-Associated Biological and Physiological Functions // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Vol. 20. — No. 23. — P. 6023.

84. Billant O., Léon A., Guellec S.L., Friocourt G., Blondel M., Voisset C. The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73: A family affair // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7. — The dominant-negative interplay between p53, p63 and p73. — No. 43. — P. 69549-69564.

85. Bourdon J.-C., Fernandes K., Murray-Zmijewski F., Liu G., Diot A., Xirodimas D.P., Saville M.K., Lane D.P. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity // Genes & Development. — 2005. — Vol. 19. — No. 18. — P. 2122-2137.

86. Courtois S., Verhaegh G., North S., Luciani M.-G., Lassus P., Hibner U., Oren M., Hainaut P. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53 // Oncogene. — 2002. — Vol. 21. — No. 44. — P. 6722-6728.

87. Joruiz S.M., Bourdon J.-C. p53 Isoforms: Key Regulators of the Cell Fate Decision // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. — 2016. — Vol. 6. — p53 Isoforms. — No. 8. — P. a026039.

88. Khoury M.P., Bourdon J.-C. The Isoforms of the p53 Protein // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. — 2010. — Vol. 2. — No. 3. — P. a000927.

89. Murray-Zmijewski F., Lane D.P., Bourdon J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress // Cell Death and Differentiation. — 2006.
— Vol. 13. — p53/p63/p73 isoforms. — No. 6. — P. 962-972.

90. Belyi V.A., Ak P., Markert E., Wang H., Hu W., Puzio-Kuter A., Levine A.J. The Origins and Evolution of the p53 Family of Genes // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. — 2010. — Vol. 2. — No. 6. — P. a001198.

91. Fagerberg L., Hallström B.M., Oksvold P., Kampf C., Djureinovic D., Odeberg J., Habuka M., Tahmasebpoor S., Danielsson A., Edlund K., Asplund A., Sjöstedt E., Lundberg E., Szigyarto C.A.-K., Skogs M., Takanen J.O., Berling H., Tegel H., Mulder J., Nilsson P., Schwenk J.M., Lindskog C., Danielsson F., Mardinoglu A., Sivertsson Å., von Feilitzen K., Forsberg M., Zwahlen M., Olsson I., Navani S., Huss M., Nielsen J., Ponten F., Uhlén M. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics // Molecular & Cellular Proteomics : MCP. — 2014. — Vol. 13. — No. 2. — P. 397-406.

92. Murray-Zmijewski F., Lane D.P., Bourdon J.-C. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress // Cell Death and Differentiation. — 2006.
— Vol. 13. — p53/p63/p73 isoforms. — No. 6. — P. 962-972.

93. Flores E.R., Sengupta S., Miller J.B., Newman J.J., Bronson R., Crowley D., Yang A., McKeon F., Jacks T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family // Cancer Cell. — 2005. — Vol. 7. — Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73. — No. 4. — P. 363-373.

94. Nemajerova A., Amelio I., Gebel J., Dötsch V., Melino G., Moll U.M. Non-oncogenic roles of TAp73: from multiciliogenesis to metabolism // Cell Death and Differentiation. — 2018. — Vol. 25. — Non-oncogenic roles of TAp73. — No. 1. — P. 144-153.

95. Novelli F., Ganini C., Melino G., Nucci C., Han Y., Shi Y., Wang Y., Candi E. p63 in corneal and epidermal differentiation // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2022.
— Vol. 610. — P. 15-22.

96. Ye S., Lee K.B., Park M.H., Lee J.-S., Kim S.M. p63 regulates growth of esophageal squamous carcinoma cells via the Akt signaling pathway // International Journal of Oncology. — 2014. — Vol. 44. — No. 6. — P. 2153-2159.

97. Koster M.I., Roop D.R. Mechanisms regulating epithelial stratification // Annual Review of Cell and Developmental Biology. — 2007. — Vol. 23. — P. 93-113.

98. Mills A.A., Zheng B., Wang X.J., Vogel H., Roop D.R., Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis // Nature. — 1999. — Vol. 398. — No. 6729. — P. 708-713.

99. Romano R.-A., Ortt K., Birkaya B., Smalley K., Sinha S. An Active Role of the ΔN Isoform of p63 in Regulating Basal Keratin Genes K5 and K14 and Directing Epidermal Cell Fate // PLoS ONE. — 2009. — Vol. 4. — No. 5. — P. e5623.

100. Su X., Chakravarti D., Flores E.R. p63 steps into the limelight: crucial roles in the suppression of tumorigenesis and metastasis // Nature Reviews. Cancer. — 2013. — Vol. 13. — p63 steps into the limelight. — No. 2. — P. 136-143.

101. Shalom-Feuerstein R., Lena A.M., Zhou H., De La Forest Divonne S., Van Bokhoven H., Candi E., Melino G., Aberdam D. Δ Np63 is an ectodermal gatekeeper of epidermal morphogenesis // Cell Death and Differentiation. — 2011. — Vol. 18. — No. 5. — P. 887-896.

102. Ferone G., Thomason H.A., Antonini D., De Rosa L., Hu B., Gemei M., Zhou H., Ambrosio R., Rice D.P., Acampora D., van Bokhoven H., Del Vecchio L., Koster M.I., Tadini G., Spencer-Dene B., Dixon M., Dixon J., Missero C. Mutant p63 causes defective expansion of ectodermal progenitor cells and impaired FGF signalling in AEC syndrome // EMBO Molecular Medicine. — 2012. — Vol. 4. — No. 3. — P. 192-205. 103. Westfall M.D., Mays D.J., Sniezek J.C., Pietenpol J.A. The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations // Molecular and Cellular Biology. — 2003.
— Vol. 23. — No. 7. — P. 2264-2276.

104. De Rosa L., Antonini D., Ferone G., Russo M.T., Yu P.B., Han R., Missero C. p63 Suppresses Non-epidermal Lineage Markers in a Bone Morphogenetic Protein-dependent Manner via Repression of Smad7 // The Journal of Biological Chemistry. — 2009. — Vol. 284. — No. 44. — P. 30574-30582.

105. Nguyen B.-C., Lefort K., Mandinova A., Antonini D., Devgan V., Della Gatta G., Koster M.I., Zhang Z., Wang J., Tommasi di Vignano A., Kitajewski J., Chiorino G., Roop D.R., Missero C., Dotto G.P. Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation // Genes & Development. — 2006. — Vol. 20. — No. 8. — P. 1028-1042.

106. Nv B. MicroRNA/mRNA regulatory networks in the control of skin development and regeneration // Cell cycle (Georgetown, Tex.). — 2012. — Vol. 11. — No. 3.

107. X S., D C., Ms C., L L., Yj G., Yl L., Ml L., A E.-N., Cj C., Mb S., I W., Er F. TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs // Nature. — 2010. — Vol. 467. — No. 7318.

108. Antonini D., Russo M.T., De Rosa L., Gorrese M., Del Vecchio L., Missero C. Transcriptional Repression of miR-34 Family Contributes to p63-Mediated Cell Cycle Progression in Epidermal Cells // Journal of Investigative Dermatology. — 2010. — Vol. 130. — No. 5. — P. 1249-1257.

109. Rivetti di Val Cervo P., Lena A.M., Nicoloso M., Rossi S., Mancini M., Zhou H., Saintigny G., Dellambra E., Odorisio T., Mahé C., Calin G.A., Candi E., Melino G. p63–microRNA feedback in keratinocyte senescence // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2012. — Vol. 109. — No. 4. — P. 1133-1138.

110. Chikh A., Matin R.N.H., Senatore V., Hufbauer M., Lavery D., Raimondi C., Ostano P., Mello-Grand M., Ghimenti C., Bahta A., Khalaf S., Akgül B., Braun K.M., Chiorino G., Philpott M.P., Harwood C.A., Bergamaschi D. iASPP/p63 autoregulatory feedback loop is required for the homeostasis of stratified epithelia // The EMBO Journal. — 2011. — Vol. 30. — No. 20. — P. 4261-4273.

111. Yi R., Poy M.N., Stoffel M., Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing "stemness" // Nature. — 2008. — Vol. 452. — No. 7184. — P. 225.

113. Scoumanne A., Harms K.L., Chen X. Structural basis for gene activation by p53 family members // Cancer Biology & Therapy. — 2005. — Vol. 4. — No. 11. — P. 1178-1185.

114. Davison T.S., Vagner C., Kaghad M., Ayed A., Caput D., Arrowsmith C.H. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53 // The Journal of Biological Chemistry. — 1999. — Vol. 274. — No. 26. — P. 18709-18714.

115. Joerger A.C., Rajagopalan S., Natan E., Veprintsev D.B., Robinson C.V., Fersht A.R. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2009. — Vol. 106. — Structural evolution of p53, p63, and p73. — No. 42. — P. 17705-17710.

116. Nehal K.S., Bichakjian C.K. Update on Keratinocyte Carcinomas // The New England Journal of Medicine. — 2018. — Vol. 379. — No. 4. — P. 363-374.

117. Pickering C.R., Zhou J.H., Lee J.J., Drummond J.A., Peng S.A., Saade R.E., Tsai K.Y., Curry J.L., Tetzlaff M.T., Lai S.Y., Yu J., Muzny D.M., Doddapaneni H., Shinbrot E., Covington K.R., Zhang J., Seth S., Caulin C., Clayman G.L., El-Naggar A.K., Gibbs R.A., Weber R.S., Myers J.N., Wheeler D.A., Frederick M.J. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. — 2014. — Vol. 20. — No. 24. — P. 6582-6592.

118. Thompson A.K., Kelley B.F., Prokop L.J., Murad M.H., Baum C.L. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death: A Systematic Review and Meta-analysis // JAMA dermatology. — 2016. — Vol. 152. — Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death. — No. 4. — P. 419-428.

119. Yue X., Zhao Y., Xu Y., Zheng M., Feng Z., Hu W. Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy // Journal of Molecular Biology. — 2017. — Vol. 429. — Mutant p53 in Cancer. — No. 11. — P. 1595-1606.

120. Alvarado-Ortiz E., de la Cruz-López K.G., Becerril-Rico J., Sarabia-Sánchez M.A., Ortiz-Sánchez E., García-Carrancá A. Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2021. — Vol. 8. — Mutant p53 Gain-of-Function. — P. 607670.

121. Melnikova V.O., Pacifico A., Chimenti S., Peris K., Ananthaswamy H.N. Fate of UVBinduced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation: relationship to skin cancer development // Oncogene. — 2005. — Vol. 24. — Fate of UVB-induced p53 mutations in SKH-hr1 mouse skin after discontinuation of irradiation. — No. 47. — P. 7055-7063.

122. Müller I., Beissert S., Kulms D. Anti-Apoptotic NF-κB and "Gain of Function" mutp53 in Concert Act Pro-Apoptotic in Response to UVB+IL-1 via Enhanced TNF Production // The Journal of Investigative Dermatology. — 2015. — Vol. 135. — No. 3. — P. 851-860.

123. Chen S., Thorne R.F., Zhang X.D., Wu M., Liu L. Non-coding RNAs, guardians of the p53 galaxy // Seminars in Cancer Biology. — 2021. — Vol. 75. — P. 72-83.

124. Pal S., Garg M., Pandey A.K. Deciphering the Mounting Complexity of the p53 Regulatory Network in Correlation to Long Non-Coding RNAs (lncRNAs) in Ovarian Cancer // Cells. — 2020. — Vol. 9. — No. 3. — P. 527.

125. Piipponen M., Nissinen L., Riihilä P., Farshchian M., Kallajoki M., Peltonen J., Peltonen S., Kähäri V.-M. p53-Regulated Long Noncoding RNA PRECSIT Promotes Progression of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma via STAT3 Signaling // The American Journal of Pathology. — 2020.
— Vol. 190. — No. 2. — P. 503-517.

126. Fischer M., Riege K., Hoffmann S. The landscape of human p53-regulated long non-coding RNAs reveals critical host gene co-regulation // Molecular Oncology. — 2023. — Vol. 17. — No. 7. — P. 1263-1279.

127. De Craene B., Denecker G., Vermassen P., Taminau J., Mauch C., Derore A., Jonkers J., Fuchs E., Berx G. Epidermal Snail expression drives skin cancer initiation and progression through

enhanced cytoprotection, epidermal stem/progenitor cell expansion and enhanced metastatic potential // Cell Death and Differentiation. — 2014. — Vol. 21. — No. 2. — P. 310-320.

128. Ribatti D., Tamma R., Annese T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview // Translational Oncology. — 2020. — Vol. 13. — Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. — No. 6. — P. 100773.

129. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition // The Journal of Clinical Investigation. — 2009. — Vol. 119. — No. 6. — P. 1420-1428.

130. Lu P., Lu Y. Born to Run? Diverse Modes of Epithelial Migration // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2021. — Vol. 9. — Born to Run?

131. Brash D.E. Sunlight and the onset of skin cancer // Trends in genetics: TIG. — 1997. — Vol. 13. — No. 10. — P. 410-414.

132. Fusenig N.E., Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes // Molecular Carcinogenesis. — 1998. — Vol. 23. — No. 3. — P. 144-158.

133. Mueller M.M., Peter W., Mappes M., Huelsen A., Steinbauer H., Boukamp P., Vaccariello M., Garlick J., Fusenig N.E. Tumor Progression of Skin Carcinoma Cells in Vivo Promoted by Clonal Selection, Mutagenesis, and Autocrine Growth Regulation by Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor // The American Journal of Pathology. — 2001. — Vol. 159. — No. 4. — P. 1567-1579.

134. He Y.-Y., Pi J., Huang J.-L., Diwan B.A., Waalkes M.P., Chignell C.F. Chronic UVA irradiation of human HaCaT keratinocytes induces malignant transformation associated with acquired apoptotic resistance // Oncogene. — 2006. — Vol. 25. — No. 26. — P. 3680-3688.

135. Sudo M., Hashimoto K., Yoshinaga M., Azimi M.D., Fayaz S.H., Hamajima N., Kondo-Ida L., Yanagisawa K., Kato M. Lithium promotes malignant transformation of nontumorigenic cells in vitro // The Science of the Total Environment. — 2020. — Vol. 744. — P. 140830.

136. Pi J., Diwan B.A., Sun Y., Liu J., Qu W., He Y., Styblo M., Waalkes M.P. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2 // Free Radical Biology & Medicine. — 2008. — Vol. 45. — Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes. — No. 5. — P. 651-658.

137. Hosseini K., Trus P., Frenzel A., Werner C., Fischer-Friedrich E. Skin epithelial cells change their mechanics and proliferation upon snail-mediated EMT signalling // Soft Matter. — 2022. — Vol. 18. — No. 13. — P. 2585-2596.

138. Räsänen K., Vaheri A. TGF-beta1 causes epithelial-mesenchymal transition in HaCaT derivatives, but induces expression of COX-2 and migration only in benign, not in malignant keratinocytes // Journal of Dermatological Science. — 2010. — Vol. 58. — No. 2. — P. 97-104.

139. Liarte S., Bernabé-García Á., Nicolás F.J. Human Skin Keratinocytes on Sustained TGF-β
Stimulation Reveal Partial EMT Features and Weaken Growth Arrest Responses // Cells. — 2020.
— Vol. 9. — No. 1. — P. 255.

140. Giglia-Mari G., Sarasin A. TP53 mutations in human skin cancers // Human Mutation. — 2003. — Vol. 21. — No. 3. — P. 217-228.

141. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.-Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis // Nature Methods. — 2012. — Vol. 9. — Fiji. — No. 7. — P. 676-682.

142. Brinkman E.K., Chen T., Amendola M., van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition // Nucleic Acids Research. — 2014. — Vol. 42.
— No. 22. — P. e168.

143. Fischer M. Census and evaluation of p53 target genes // Oncogene. — 2017. — Vol. 36. — No. 28. — P. 3943-3956.

144. Blanchard G., Pich C., Hohl D. HaCaT cells as a model system to study primary cilia in keratinocytes // Experimental Dermatology. — 2022. — Vol. 31. — No. 8. — P. 1276-1280.

145. Mahagita C., Grassl S.M., Piyachaturawat P., Ballatori N. Human organic anion transporter
1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport //
American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology. — 2007. — Vol. 293.
— No. 1. — P. G271-278.

146. Shapanis A., Lai C., Smith S., Coltart G., Sommerlad M., Schofield J., Parkinson E., Skipp P., Healy E. Identification of proteins associated with development of metastasis from cutaneous squamous cell carcinomas (cSCCs) via proteomic analysis of primary cSCCs // The British Journal of Dermatology. — 2021. — Vol. 184. — No. 4. — P. 709-721.

147. Hoesl C., Zanuttigh E., Fröhlich T., Philippou-Massier J., Krebs S., Blum H., Dahlhoff M. The secretome of skin cancer cells activates the mTOR/MYC pathway in healthy keratinocytes and induces tumorigenic properties // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.
2020. Vol. 1867. No. 8. P. 118717.

148. Dickinson S.E., Khawam M., Kirschnerova V., Vaishampayan P., Centuori S.M., Saboda K., Calvert V.S., Petricoin E.F., Curiel-Lewandrowski C. Increased PD-L1 Expression in Human Skin Acutely and Chronically Exposed to UV Irradiation // Photochemistry and Photobiology. — 2021.
— Vol. 97. — No. 4. — P. 778-784.

149. Ock C.-Y., Kim S., Keam B., Kim M., Kim T.M., Kim J.-H., Jeon Y.K., Lee J.-S., Kwon S.K., Hah J.H., Kwon T.-K., Kim D.-W., Wu H.-G., Sung M.-W., Heo D.S. PD-L1 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7. — No. 13. — P. 15901-15914.

150. Yu Z., Yu Q., Xu H., Dai X., Yu Y., Cui L., Chen Y., Gu J., Zhang X., Guo C., Shi Y. IL-17A Promotes Psoriasis-Associated Keratinocyte Proliferation through ACT1-Dependent Activation of YAP-AREG Axis // The Journal of Investigative Dermatology. — 2022. — Vol. 142. — No. 9. — P. 2343-2352.

151. Wang L., Zhang H., Lu J., Zhang Z., Wu H., Liang Z. AREG mediates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells via the EGFR/ERK/NF-κB signalling pathway // Oncology Reports. — 2020. — Vol. 43. — No. 5. — P. 1558-1568.

152. Sjoestroem C., Khosravi S., Cheng Y., Safaee Ardekani G., Martinka M., Li G. DLC1 expression is reduced in human cutaneous melanoma and correlates with patient survival // Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. — 2014. — Vol. 27. — No. 9. — P. 1203-1211.

153. Wang D., Qian X., Rajaram M., Durkin M.E., Lowy D.R. DLC1 is the principal biologicallyrelevant down-regulated DLC family member in several cancers // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7. — No. 29. — P. 45144-45157.

154. Sanchez-Solana B., Wang D., Qian X., Velayoudame P., Simanshu D.K., Acharya J.K., Lowy D.R. The tumor suppressor activity of DLC1 requires the interaction of its START domain with Phosphatidylserine, PLCD1, and Caveolin-1 // Molecular Cancer. — 2021. — Vol. 20. — P. 141.

155. Cao X., Kaneko T., Li J.S., Liu A.-D., Voss C., Li S.S.C. A phosphorylation switch controls the spatiotemporal activation of Rho GTPases in directional cell migration // Nature Communications. — 2015. — Vol. 6. — P. 7721.

156. Dierks S., von Hardenberg S., Schmidt T., Bremmer F., Burfeind P., Kaulfuß S. Leupaxin stimulates adhesion and migration of prostate cancer cells through modulation of the phosphorylation status of the actin-binding protein caldesmon // Oncotarget. — 2015. — Vol. 6.
— No. 15. — P. 13591-13606.

157. Cabral-Pacheco G.A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C., Ramirez-Acuña J.M., Perez-Romero B.A., Guerrero-Rodriguez J.F., Martinez-Avila N., Martinez-Fierro M.L. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — Vol. 21. — No. 24. — P. 9739.

158. Napoli S., Scuderi C., Gattuso G., Di Bella V., Candido S., Basile M.S., Libra M., Falzone L.
Functional Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Melanoma // Cells. — 2020.
Vol. 9. — No. 5. — P. 1151.

159. Zeng Z., Wu W., Yang J., Tang Z., Chen D., Qiu M., Luo H., Wang Z., Jin Y., Wang D., Xu R. Prognostic relevance of melanoma antigen D1 expression in colorectal carcinoma // Journal of Translational Medicine. — 2012. — Vol. 10. — P. 181.

160. Wang Z., He T., Lv W., Hu J. Down-regulation of FBP1 in lung adenocarcinoma cells promotes proliferation and invasion through SLUG mediated epithelial mesenchymal transformation // Translational Cancer Research. — 2023. — Vol. 12. — No. 2.

161. Ondruššek R., Kvokačková B., Kryštofová K., Brychtová S., Souček K., Bouchal J. Prognostic value and multifaceted roles of tetraspanin CD9 in cancer // Frontiers in Oncology. — 2023. — Vol. 13. — P. 1140738.

162. Jiang M., Sun Z., Dang E., Li B., Fang H., Li J., Gao L., Zhang K., Wang G. TGF β /SMAD/microRNA-486-3p Signaling Axis Mediates Keratin 17 Expression and Keratinocyte Hyperproliferation in Psoriasis // Journal of Investigative Dermatology. — 2017. — Vol. 137. — No. 10. — P. 2177-2186.

163. Hatta M., Miyake Y., Uchida K., Yamazaki J. Keratin 13 gene is epigenetically suppressed during transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in a human keratinocyte cell line // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2018. — Vol. 496. — No. 2. — P. 381-386.
164. Wang F., Chen S., Liu H.B., Parent C.A., Coulombe P.A. Keratin 6 regulates collective keratinocyte migration by altering cell-cell and cell-matrix adhesion // The Journal of Cell Biology.
2018. Vol. 217. No. 12. P. 4314-4330.

165. Teng Y., Fan Y., Ma J., Lu W., Liu N., Chen Y., Pan W., Tao X. The PI3K/Akt Pathway: Emerging Roles in Skin Homeostasis and a Group of Non-Malignant Skin Disorders // Cells. — 2021. — Vol. 10. — The PI3K/Akt Pathway. — No. 5. — P. 1219.

166. Whyte J.L., Smith A.A., Helms J.A. Wnt Signaling and Injury Repair // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. — 2012. — Vol. 4. — No. 8. — P. a008078.

167. Lang C.M.R., Chan C.K., Veltri A., Lien W.-H. Wnt Signaling Pathways in Keratinocyte Carcinomas // Cancers. — 2019. — Vol. 11. — No. 9. — P. 1216.

168. Fullard N., Moles A., O'Reilly S., van Laar J.M., Faini D., Diboll J., Reynolds N.J., Mann D.A., Reichelt J., Oakley F. The c-Rel Subunit of NF-κB Regulates Epidermal Homeostasis and Promotes Skin Fibrosis in Mice // The American Journal of Pathology. — 2013. — Vol. 182. — No. 6. — P. 2109-2120.

169. Wullaert A., Bonnet M.C., Pasparakis M. NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation // Cell Research. — 2011. — Vol. 21. — No. 1. — P. 146-158.

170. Antonangeli F., Natalini A., Garassino M.C., Sica A., Santoni A., Di Rosa F. Regulation of PD-L1 Expression by NF-κB in Cancer // Frontiers in Immunology. — 2020. — Vol. 11. — P. 584626.

171. Betzler A.C., Theodoraki M.-N., Schuler P.J., Döscher J., Laban S., Hoffmann T.K., Brunner C. NF-κB and Its Role in Checkpoint Control // International Journal of Molecular Sciences. — 2020. — Vol. 21. — No. 11. — P. 3949.

172. Li J., Wu T., Song K., Zhu L., Wang Y., Chen T., Wang X. Integrative network analysis reveals subtype-specific long non-coding RNA regulatory mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma // Computational and Structural Biotechnology Journal. — 2023. — Vol. 21. — P. 535-549.

173. Natarelli N., Boby A., Aflatooni S., Tran J.T., Diaz M.J., Taneja K., Forouzandeh M.
Regulatory miRNAs and lncRNAs in Skin Cancer: A Narrative Review // Life (Basel, Switzerland).
2023. Vol. 13. Regulatory miRNAs and lncRNAs in Skin Cancer. No. 8. P. 1696.

174. Jafari N., Nasiran Najafabadi A., Hamzei B., Ataee N., Ghasemi Z., Sadeghian-Rizi T., Honardoost M.A., Zamani A., Dolatabadi N.F., Tabatabaeian H. ESRG, LINC00518 and PWRN1 are newly-identified deregulated lncRNAs in colorectal cancer // Experimental and Molecular Pathology. — 2022. — Vol. 124. — P. 104732.

175. Shen L., Li Y., Hu G., Huang Y., Song X., Yu S., Xu X. MIR155HG Knockdown Inhibited the Progression of Cervical Cancer by Binding SRSF1 // OncoTargets and Therapy. — 2020. — Vol. 13. — P. 12043-12054.

176. Lin H., Ni R., Li D., Zhao M., Li Y., Li K., Zhang Q., Huang C., Huang S. LncRNA MIR155HG Overexpression Promotes Proliferation, Migration, and Chemoresistance in Gastric Cancer Cells // International Journal of Medical Sciences. — 2023. — Vol. 20. — No. 7. — P. 933-942. 177. Peng L., Chen Z., Chen Y., Wang X., Tang N. MIR155HG is a prognostic biomarker and associated with immune infiltration and immune checkpoint molecules expression in multiple cancers // Cancer Medicine. — 2019. — Vol. 8. — No. 17. — P. 7161-7173.

178. Xiao D., Cui X., Fang N., Yu S., Wang X. LINC01303 promotes the proliferation and migration of laryngeal carcinoma by regulating miR-200c/TIMP2 axis // American Journal of Translational Research. — 2021. — Vol. 13. — No. 3. — P. 1643-1656.

179. Chung I.-H., Lu P.-H., Lin Y.-H., Tsai M.-M., Lin Y.-W., Yeh C.-T., Lin K.-H. The long noncoding RNA LINC01013 enhances invasion of human anaplastic large-cell lymphoma // Scientific Reports. — 2017. — Vol. 7. — No. 1. — P. 295.

180. Zhang X., Xu X., Zhang Z., Xue C., Kong Z., Wu S., Yun X., Fu Y., Zhu C., Qin X. Linc-KILH potentiates Notch1 signaling through inhibiting KRT19 phosphorylation and promotes the malignancy of hepatocellular carcinoma // International Journal of Biological Sciences. — 2021.
— Vol. 17. — No. 3. — P. 768-780.

181. Du T., Gao Q., Zhao Y., Gao J., Li J., Wang L., Li P., Wang Y., Du L., Wang C. Long Noncoding RNA LINC02474 Affects Metastasis and Apoptosis of Colorectal Cancer by Inhibiting the Expression of GZMB // Frontiers in Oncology. — 2021. — Vol. 11. — P. 651796.

182. Ma Y., Sun Y., Zhao X., Li J., Fu X., Gong T., Zhang X. Identification of m5C-related lncRNAs signature to predict prognosis and therapeutic responses in esophageal squamous cell carcinoma patients // Scientific Reports. — 2023. — Vol. 13. — P. 14499.

183. Yang W., Ge F., Lu S., Shan Z., Peng L., Chai J., Liu H., Li B., Zhang Z., Huang J., Hua Y., Zhang Y. LncRNA MSC-AS1 Is a Diagnostic Biomarker and Predicts Poor Prognosis in Patients With Gastric Cancer by Integrated Bioinformatics Analysis // Frontiers in Medicine. — 2021. — Vol. 8. — P. 795427.

184. Ghafouri-Fard S., Harsij A., Farahzadi H., Hussen B.M., Taheri M., Mokhtari M. A concise review on the role of MIR100HG in human disorders // Journal of Cellular and Molecular Medicine. — 2023. — Vol. 27. — No. 16. — P. 2278-2289.

185. Guo J., Gan Q., Gan C., Zhang X., Ma X., Dong M. LncRNA MIR205HG regulates melanomagenesis via the miR-299-3p/VEGFA axis // Aging. — 2021. — Vol. 13. — No. 4. — P. 5297-5311.

186. Li H., Jia J., Yang L., Chu J., Sheng J., Wang C., Meng W., Jia Z., Yin H., Wan J., He F. LncRNA MIR205HG Drives Esophageal Squamous Cell Carcinoma Progression by Regulating miR-214/SOX4 Axis // OncoTargets and therapy. — 2020. — Vol. 13. — P. 13097-13109.

187. Zhao S., Guan B., Mi Y., Shi D., Wei P., Gu Y., Cai S., Xu Y., Li X., Yan D., Huang M., Li D. LncRNA MIR17HG promotes colorectal cancer liver metastasis by mediating a glycolysis-associated positive feedback circuit // Oncogene. — 2021. — Vol. 40. — No. 28. — P. 4709-4724.

188. Yuan G., Liu B., Han W., Zhao D. LncRNA-MIR17HG mediated upregulation of miR-17 and miR-18a promotes colon cancer progression via activating Wnt/ β -catenin signaling // Translational Cancer Research. — 2019. — Vol. 8. — No. 4. — P. 1097-1108.

189. Hu W.L., Jin L., Xu A., Wang Y.F., Thorne R.F., Zhang X.D., Wu M. GUARDIN is a p53responsive long non-coding RNA that is essential for genomic stability // Nature Cell Biology. — 2018. — Vol. 20. — No. 4. — P. 492-502.

190. Mi Y.-Y., Sun C.-Y., Zhang L.-F., Wang J., Shao H.-B., Qin F., Xia G.-W., Zhu L.-J. Long Non-coding RNAs LINC01679 as a Competitive Endogenous RNAs Inhibits the Development and Progression of Prostate Cancer via Regulating the miR-3150a-3p/SLC17A9 Axis // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2021. — Vol. 9. — P. 737812.

191. Maziveyi M., Alahari S.K. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue // Oncotarget. — 2017. — Vol. 8. — Cell matrix adhesions in cancer. — No. 29. — P. 48471-48487.

192. Nurmagambetova A., Mustyatsa V., Saidova A., Vorobjev I. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT // Scientific Reports. — 2023. — Vol. 13. — No. 1. — P. 22164.

193. Jin H., Tang Y., Yang L., Peng X., Li B., Fan Q., Wei S., Yang S., Li X., Wu B., Huang M., Tang S., Liu J., Li H. Rab GTPases: Central Coordinators of Membrane Trafficking in Cancer // Frontiers in Cell and Developmental Biology. — 2021. — Vol. 9. — Rab GTPases. — P. 648384.

194. Slater N.A., Googe P.B. PD-L1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma correlates with risk of metastasis // Journal of Cutaneous Pathology. — 2016. — Vol. 43. — No. 8. — P. 663-670.

195. Schaper K., Köther B., Hesse K., Satzger I., Gutzmer R. The pattern and clinicopathological correlates of programmed death-ligand 1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma // The British Journal of Dermatology. — 2017. — Vol. 176. — No. 5. — P. 1354-1356.

196. Sunshine J.C., Nguyen P.L., Kaunitz G.J., Cottrell T.R., Berry S., Esandrio J., Xu H., Ogurtsova A., Bleich K.B., Cornish T.C., Lipson E.J., Anders R.A., Taube J.M. PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison // Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research. — 2017. — Vol. 23. — PD-L1 Expression in Melanoma. — No. 16. — P. 4938-4944.

197. Muralidharan S., Sehgal M., Soundharya R., Mandal S., Majumdar S.S., Yeshwanth M., Saha A., Jolly M.K. PD-L1 Activity Is Associated with Partial EMT and Metabolic Reprogramming in Carcinomas // Current Oncology (Toronto, Ont.). — 2022. — Vol. 29. — No. 11. — P. 8285-8301.

198. Takada K., Komine-Aizawa S., Hirohata N., Trinh Q.D., Nishina A., Kimura H., Hayakawa S. Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8 // BMC Immunology. — 2017. — Vol. 18. — Poly I. — No. 1. — P. 19.

199. Su L., Fu L., Li X., Zhang Y., Li Z., Wu X., Li Y., Bai X., Hu D. Loss of CAR promotes migration and proliferation of HaCaT cells, and accelerates wound healing in rats via Src-p38 MAPK pathway // Scientific Reports. — 2016. — Vol. 6. — P. 19735.

200. Rousselle P., Braye F., Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies: Wound healing and fibrosis – State of play // Advanced Drug Delivery Reviews. — 2019. — Vol. 146. — Re-epithelialization of adult skin wounds. — P. 344-365.

201. Nguyen P.D., Tutela J.P., Thanik V.D., Knobel D., Allen R.J., Chang C.C., Levine J.P., Warren S.M., Saadeh P.B. Improved diabetic wound healing through topical silencing of p53 is associated with augmented vasculogenic mediators // Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. — 2010. — Vol. 18. — No. 6. — P. 553-559.

202. Weinmuellner R., Kryeziu K., Zbiral B., Tav K., Schoenhacker-Alte B., Groza D., Wimmer L., Schosserer M., Nagelreiter F., Rösinger S., Mildner M., Tschachler E., Grusch M., Grillari J., Heffeter P. Long-term exposure of immortalized keratinocytes to arsenic induces EMT, impairs differentiation in organotypic skin models and mimics aspects of human skin derangements // Archives of Toxicology. — 2018. — Vol. 92. — No. 1. — P. 181-194.

203. Paramio J.M., Segrelles C., Laín S., Gómez-Casero E., Lane D.P., Lane E.B., Jorcano J.L. p53 is phosphorylated at the carboxyl terminus and promotes the differentiation of human HaCaT keratinocytes // Molecular Carcinogenesis. — 2000. — Vol. 29. — No. 4. — P. 251-262.

204. Kuryłowicz K., Cierniak A., Madej E., Skalniak Ł., Wolnicka-Głubisz A. Resveratrol enhances apoptosis induced by the heterocyclic aromatic amines in p53-wt LoVo cells, but not in p53-deficient HaCaT cells // Acta Biochimica Polonica. — 2020. — Vol. 67. — No. 4. — P. 605-611.

205. Herbert K.J., Cook A.L., Snow E.T. SIRT1 inhibition restores apoptotic sensitivity in p53mutated human keratinocytes // Toxicology and Applied Pharmacology. — 2014. — Vol. 277. — No. 3. — P. 288-297.

206. Kane M.S., Paris A., Codron P., Cassereau J., Procaccio V., Lenaers G., Reynier P., Chevrollier A. Current mechanistic insights into the CCCP-induced cell survival response // Biochemical Pharmacology. — 2018. — Vol. 148. — P. 100-110.

207. Rusanov A.L., Luzgina N.G., Lisitsa A.V. Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity towards HaCaT Keratinocytes: Comparative Analysis of Methods for Evaluation of Cell Viability // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. — 2017. — Vol. 163. — Sodium Dodecyl Sulfate Cytotoxicity towards HaCaT Keratinocytes. — No. 2. — P. 284-288.

208. Rusanov A.L., Petushkova N.A., Poverennaya E.V., Nakhod K.V., Larina O.V., Lisitsa A.V., Luzgina N.G. [Proteomic profiling of HaCaT keratinocytes exposed to skin damaging detergents] // Biomeditsinskaia Khimiia. — 2017. — Vol. 63. — No. 5. — P. 405-412.

209. Li J.-Y., Cui D.-L., Xie Y.-M., Su J.-Z., Zhang M.-Y., Niu Y.-Y., Xiang P. Mechanisms of Cd-Induced Cytotoxicity in Normal Human Skin Keratinocytes: Implication for Human Health // International Journal of Molecular Sciences. — 2022. — Vol. 23. — Mechanisms of Cd-Induced Cytotoxicity in Normal Human Skin Keratinocytes. — No. 19. — P. 11767.

210. Aimola P., Carmignani M., Volpe A.R., Di Benedetto A., Claudio L., Waalkes M.P., van Bokhoven A., Tokar E.J., Claudio P.P. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells // PloS One. — 2012. — Vol. 7. — No. 3. — P. e33647.

211. Segre J.A. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders // Journal of Clinical Investigation. — 2006. — Vol. 116. — No. 5. — P. 1150-1158.

212. Nzengue Y., Steiman R., Guiraud P. Characterization of the cell death induced by cadmium in HaCaT and C6 cell lines // Free Radical Research. — 2008. — Vol. 42. — No. 2. — P. 142-153.

213. Leigh I.M., Navsaria H., Purkis P.E., McKay I.A., Bowden P.E., Riddle P.N. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro // The British Journal of Dermatology. — 1995. — Vol. 133. — No. 4. — P. 501-511.

214. Jin L., Wang G. Keratin 17: a critical player in the pathogenesis of psoriasis // Medicinal Research Reviews. — 2014. — Vol. 34. — Keratin 17. — No. 2. — P. 438-454.

215. Xiao C.-Y., Zhu Z.-L., Zhang C., Fu M., Qiao H.-J., Wang G., Dang E.-L. Small interfering RNA targeting of keratin 17 reduces inflammation in imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis // Chinese Medical Journal. — 2020. — Vol. 133. — No. 24. — P. 2910-2918.

216. Nair R.R., Hsu J., Jacob J.T., Pineda C.M., Hobbs R.P., Coulombe P.A. A role for keratin 17 during DNA damage response and tumor initiation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. — 2021. — Vol. 118. — No. 13. — P. e2020150118.

217. Liao C., Xie G., Zhu L., Chen X., Li X., Lu H., Xu B., Ramot Y., Paus R., Yue Z. p53 Is a Direct Transcriptional Repressor of Keratin 17: Lessons from a Rat Model of Radiation Dermatitis // The Journal of Investigative Dermatology. — 2016. — Vol. 136. — p53 Is a Direct Transcriptional Repressor of Keratin 17. — No. 3. — P. 680-689.

218. Baran W., Szepietowski J.C., Szybejko-Machaj G. Expression of p53 protein in psoriasis // Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica, Et Adriatica. — 2005. — Vol. 14. — No. 3. — P. 79-83.

219. Carlsson H., Petersson S., Enerbäck C. Cluster analysis of S100 gene expression and genes correlating to psoriasin (S100A7) expression at different stages of breast cancer development // International Journal of Oncology. — 2005. — Vol. 27. — No. 6. — P. 1473-1481.