

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра эмбриологии

Толстолужинская Анастасия Евгеньевна
ПОЛУЧЕНИЕ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ ЛИНИЙ ФИБРОБЛАСТОВ И
ЭПИДЕРМАЛЬНЫХ КЕРАТИНОЦИТОВ ИЗ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КОЖИ
ЧЕЛОВЕКА, ИХ ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
ГУРСКАЯ НАДЕЖДА ГЕОРГИЕВНА

Куратор:
кандидат биологических наук
ЕРМАКОВ АЛЕКСАНДР СЕРГЕЕВИЧ

Оглавление

Список сокращений	4
1 Введение.....	5
2 Обзор литературы.....	7
2.1 Иммуортализованные культуры клеток.....	7
2.1.1 Причины старения и ограниченности пролиферации клеток	7
2.1.2 Иммуортализация клеток	9
2.1.3 Эквиваленты кожи	12
2.1.4 Bmi-1, c-Myc	13
2.1.5 p63	17
2.1.6 Супрессоры метастазирования	18
2.1.7 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки	23
2.2 Клеточный состав эпидермиса.....	25
2.2.1 Стволовые клетки эпидермиса	26
2.2.2 Закладка эпителия: участие эпителиально-мезенхимальных и мезенхимально-эпителиальных переходов.	28
2.2.3 Кератинизация. Маркерные белки	31
2.2.4 Иммуортализованные культуры кератиноцитов. HaCaT.....	42
2.2.5 Фибробласты.....	44
2.3 Генодерматозы.....	49
3 Материалы и методы.....	53
3.1 Получение гена Bmi-1 для клонирования и получения иммуортализованных культур клеток.....	57
3.2 Получение конструкции CMV P14 пром для клонирования Bmi-1 и получения иммуортализованных культур клеток.....	58
3.3 Получение вектора CMV P14 пром – Bmi-1	59
3.4 Клеточные линии.....	60
3.5 Анализ образцов кДНК.....	61
3.6 Иммуногистохимия	63
4 Результаты.....	66

4.1	Характеристика клеточных линий.....	66
4.1.1	Анализ с помощью RT PCR.....	66
4.2	Иммуногистохимическое окрашивание.....	76
4.2.1	Анализ распределения Vmi1 и hTERT иммортализованных культур клеток	76
4.2.2	Анализ распределения экспрессии структурных белков в образцах кожи от здорового донора и больных ВБЭ с неизвестной мутацией.	78
4.3	Получение вектора CMV pL4 puro Vmi-1	80
5	Обсуждение.....	85
5.1	Характеристика клеточных линий.....	85
5.1.1	Анализ изменений в экспрессии онкогенов	85
5.1.2	Маркеры плюрипотентности (факторы Яманака для ИПСК).....	87
5.1.3	Гены, кодирующие маркерные белки фибробластов.....	88
5.1.4	Гены, кодирующие маркеры кератиноцитов	91
5.2	Иммуногистохимическое окрашивание.....	94
5.2.1	Анализ распределения Vmi-1 и hTERT иммортализованных культур клеток.....	94
5.2.2	Анализ распределения экспрессии структурных белков в образцах кожи от здорового донора и больных ВБЭ с неизвестной мутацией.	95
5.3	Получение вектора P14 CMV puro Vmi-1	96
6	Выводы.....	97
7	Список литературы	98

Список сокращений

ВКМ – внутриклеточная масса

ДБЭ – дистрофический буллезный эпидермолиз

ИГХ – иммуногистохимия (метод окрашивания)

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

К – кератин

МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход

(В)БЭ – (врожденный) буллезный эпидермолиз

ПБЭ – буллезный эпидермолиз простого типа

ПКС – протеинкиназа С

ПоБЭ – пограничный буллезный эпидермолиз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП – эпителиально-мезенхимальных переход

ЕК – кератиноциты

Фб – фибробласты

HPV – папилломавирус человека

PRC – поликомб-репрессивный комплекс

1 Введение

Нормальные соматические клетки человека ограничены в своей способности к пролиферации. С каждым циклом деления длина теломер таких клеток уменьшается, и, в конечном счете, это приводит к остановке делений и к старению. Но есть клетки, которые способны делиться неограниченное количество раз благодаря активности в них фермента теломеразы, способного сохранять длину теломер хромосом. Теломераза – фермент, имеющий в своем составе РНК-компонент (hTR или TERC), работающего как матрица для поддержания теломер, и каталитический домен – реверсную транскриптазу (hTERT). Активность теломеразы проявляется только в иммортализованных клетках, в стволовых клетках и также в 85% клеток опухолей человека, и именно в этих клетках наблюдается повышенная экспрессия *hTERT* (Nakamura et al., 2017). Это ведет к повышению вероятности возникновения опухолевых клеток. Поэтому также основная задача при получении иммортализованных культур состоит в том, чтобы клетки сохраняли свои исходные дифференцированные свойства, по-прежнему экспрессировали свои специфические белки и не становились раковыми, приобретая неопластические свойства.

Одним из важнейших генов, продукты которого обнаруживаются в иммортализованных клетках, является ген *Bmi-1*, продукт которого ответственен за регуляцию пролиферации и старение, работающий посредством ремоделирования хроматина. Оверэкспрессия *Bmi-1* приводит к активации теломеразы hTERT и индуцирует работу теломеразы в иммортализованных эпителиальных клетках млекопитающих. Индуцирование теломеразы с помощью *Bmi-1* зависит от типа клеток или от механизма запуска. Основной принцип запуска иммортализации заключается в том, что *Bmi-1* связывается с промотером *hTERT* и активирует транскрипцию (Dimri et al., 2002).

В настоящее время существует проблема получения клеток с увеличенным пролиферативным потенциалом и отсутствием старения, то есть immortalized клеточных культур, что позволило бы решить вопрос получения культур различных наследственных заболеваний с целью исследования характеристик клеток и различных методов лечения. Так, например, ограниченная доступность первичных кератиноцитов и фибробластов для создания моделей генодерматозов препятствует широкомасштабному внедрению моделей кожи для различных исследований (Smits et al., 2017). immortalization линий клеток может расширить возможности и обойти эту проблему.

Цели:

- I. охарактеризовать первичные линии клеток и полученные из них immortalized линии эпидермальных кератиноцитов и фибробластов от здоровых доноров и от больных врожденным буллезным эпидермолизом;
- II. получить плазмиду с кДНК гена Vmi-1 для последующего использования в создании immortalized линий клеток.

Задачи:

- Охарактеризовать экспрессию маркерных белков immortalized кератиноцитов и фибробластов с помощью ПЦР в реальном времени. Сравнить данные культуры с нормальными культурами клеток (здоровых и больных буллезным эпидермолизом (БЭ));
- Изучить immortalized культуры клеток больных БЭ с помощью метода иммуногистохимического окрашивания на hTERT и Vmi-1;
- Получить плазмиду с кДНК гена Vmi-1 и устойчивостью к антибиотику для последующей трансфекции клеток;
- Изучить immortalized культуры клеток больных БЭ с помощью метода иммуноцитохимического окрашивания.

2 Обзор литературы

2.1 Иммуортиализованные культуры клеток

2.1.1 Причины старения и ограниченности пролиферации клеток

Нормальные клетки человека имеют ограниченное количество циклов деления, которое сокращается к старости. Считается, что в первую очередь это связано с длиной теломер. Теломеры – это некодирующие последовательности ДНК, расположенные в конце хромосом. Они включают повторяющиеся последовательности ДНК (TTAGGG), которые укорачиваются с каждым циклом деления, то есть с каждым реплицированием ДНК. Длина может быть сохранена благодаря действию теломеразной активности. Таким образом, теломеры ДНК не только показывают ферментам о конце репликации, но и укорочение теломер вызывает старение в нормальных человеческих клетках. Хотя в половых и стволовых клетках этого не происходит из-за стабилизации длины теломер с помощью фермента теломеразы (Dickson et al., 2000; Dimri et al., 2002).

Теломераза – это рибонуклепротеин, включающий РНК-компонент (hTR или TERC), каталитический домен – реверсную транскриптазу (hTERT) и дискерин. В большинстве соматических клетках человека теломеразная активность отсутствует и теломеры укорачиваются с каждым прошедшим делением. Активность теломеразы проявляется только в иммуортиализованных клетках, в стволовых клетках и также в 85% клеток опухолей человека (Nakamura et al., 2017).

Деятельность теломеразы в целом подавляется в большинстве клеток организма человека. РНК компонент экспрессируется в большинстве клеток, а вот hTERT – лишь в некоторых типах клеток, включая половые клетки, стволовые и иммуортиализованные клетки (Nakamura et al., 2017). Этот ген часто индуцируется при иммуортиализации клеток: повышенная экспрессия гена может восстановить активность теломеразы и предотвратить укорочение теломер во многих типах клеток (Dimri et al., 2002). hTERT создает одноцепочечную ДНК на основе матричной одноцепочечной РНК TERC, таким образом добавляя в

конце хромосом повторяющуюся последовательность 5'-ТТАGGG к 3'-нити хромосом (Рис.1) (Zhao et al., 2019).

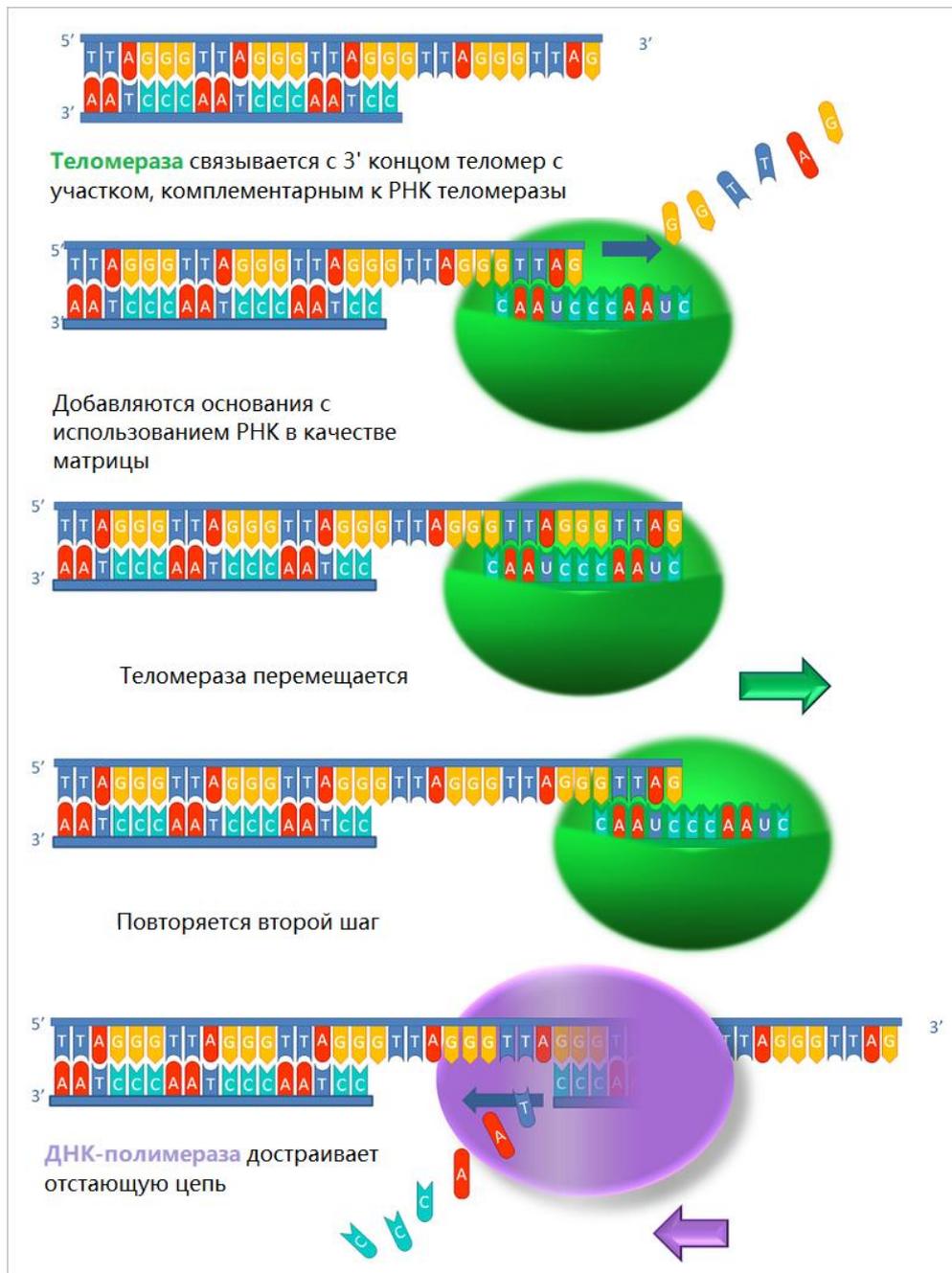


Рисунок 1. Механизм удлинения теломер в результате активности теломеразы. (Uzbas, 2011)

Транскрипция *hTERT* запускается через β -катенин при помощи одного из факторов плюрипотентности Klf4, направляющего его на промотор гена *hTERT* (Hoffmeyer et al., 2012). Также индуцирующим фактором для работы теломеразы является белок с-Мус, который также используется для

иммортализации некоторых клеток человека, в том числе и фибробластов (Dimri et al., 2002). Такая регуляция активности гена *hTERT* объясняется наличием в промоторе нескольких сайтов связывания с-Мус (Rubtsova et al., 2018).

2.1.2 Иммортализация клеток

С целью обойти проблему старения клеток ученые используются различные способы иммортализации клеточных культур с помощью включения или выключения экспрессии различных генов, которые в первую очередь нацелены на активацию работы теломеразы. Обычно для получения иммортализованных культур клеток вызывают экспрессию *hTERT*, *Bmi-1*, гена, кодирующего SV40LT, или таких онкогенов, как HPVE6/E7 или *c-Мус*. Эктопическая экспрессия *hTERT* ранее использовалась для получения иммортализованности соматических клеток без каких-либо изменений в нормальном кариотипе (Ahuja et al, 2005). В данной работе исследование проводится на клетках эпидермиса кожи – кератиноцитах и фибробластах, поэтому в первую очередь нас будут интересовать иммортализация именно этих клеток.

Если ввести *hTERT* в фибробласты человека, то это приводит к стабильности теломер и неограниченному репликативному потенциалу этих типов клеток. Но таким способом нельзя привести к стабильности теломер у всех клеточных линий. Для искусственного получения иммортализованности иногда необходимо изменить работу и некоторых других генов. Например, в работе Диксона было показано, что кератиноцитам человека для иммортализации не достаточна эктопическая экспрессия *hTERT*. Для их иммортализации оказалось необходимым выключение локуса *pRB/p16^{INK4a}*, который контролирует клеточный цикл вместе с *hTERT*. *pRB/p16^{INK4a}* отвечает за программу терминальной дифференцировки и активирует работу белка Rb (retinoblastoma protein). Rb препятствует активному клеточному росту и

пролиферации, ингибируя клеточный цикл до того момента, когда клетка не станет готова к нормальному делению, то есть Rb активирует переход из G1 в S-фазу (Smith et al., 2016). Также pRB/p16^{INK4a} ингибирует действие циклин-зависимых киназ (CDK4 и CDK6). Причем кератиноциты, не смотря на потерю pRB/p16^{INK4a} и экспрессию hTERT, способны дифференцироваться, экспрессировать специфичные для них белки и формировать эпителий *in vitro* и *in vivo* (Dickson et al., 2000). Они показали также, что стабилизация теломер не приводит к остановке старения кератиноцитов, но экспрессия самой теломеразы позволяет возникать редким иммортализованным клонам из культуры (Dickson et al., 2000; Sedivy., 1998).

В результате им удалось получить две клеточные культуры N/TERT1 и N/TERT2G из первичных кератиноцитов с геном hTERT и спонтанной потерей гена клеточного цикла pRB/p16^{INK4a}, что позволило использовать эти культуры для исследования кожных заболеваний, к примеру, псориаз-подобных заболеваний, или для анализа экспрессии мРНК, для изучения морфологии кератиноцитов после добавления разных цитокинов или ретиноевой кислоты (Smits et al., 2017). Эти клетки не потеряли своих качественных свойств, по-прежнему были способны отвечать на медиаторы воспаления и развиваться в морфологически и функционально нормальные кератиноциты. Таким образом, они имели нормальные характеристики дифференцировки в монослойные и органотипические модели кожи (Dickson et al., 2000; Smits et al., 2017).

Ген обратной транскриптазы теломеразы человека hTERT можно активировать, например, с помощью двух различных способов: с использованием piggyBac транспозона или доставка с помощью SV40 Large T (SV40LT). Оба подхода в работах Ахуджа и соавторов позволили фибробластам расти непрерывно без старения, и ни один из них не вызывал образование тератомы в иммунодефицитной среде. Однако, в фибробластах, иммортализованных с помощью SV40LT, накапливались хромосомные перестройки, а в клетках, иммортализованных с помощью транспозона,

кариотип оставался стабильным (Ahuja et al., 2005). В отличие от мышинных кератиноцитов, человеческие более резистентны к трансформации *in vitro*. Иммуортализацию возможно вызвать с помощью SV40, но это всегда приводит к разным последствиям в дифференцировке клеток (Boukamp et al., 1988).

Способность SV40LT иммуортализовать соматические клетки сильно зависит от его способности образовывать комплекс с p53, то есть ингибировать его. p53 является стрессовым белком, он взаимодействует с проапоптотическим геном *Bax* путём активации пути апоптоза PUMA, который блокирует действие Bcl-2 (Amsterdam et al., 1996; Hussein, 2005). В ядре p53 стимулирует транскрипцию гена *SKI*, кодирующего белок p21, который блокирует переход на следующий этап клеточного цикла и останавливает клетку либо на стадии G₁, либо на переходе от G₂ к M (De Felici, Klinger, 2015). Инактивация любых p53-зависимых путей важна для иммуортализации кератиноцитов. Доказано, что p53 очень важный компонент остановки роста теломер в фибробластах (Dickson et al., 2000; Wynford-Thomas, 1999).

Вообще, SV40LT, а также E1A (белок аденовируса), E6 и E7 (белки папилломавируса) часто использовались для иммуортализации теломер в первую очередь для нейтрализации активности p53 и Rb, чтобы обойти старение клеточной культуры. И уже на втором этапе создания таких культур используется введение hTERT или генов, его активирующих, что служит для поддержания стабильности теломер. Этот поэтапный подход обеспечивает ценное средство для моделирования злокачественной трансформации в генетически определенных условиях (Sedivy, 1998; Smith et al., 2016).

В работе Смита 2016 года был предложен метод одношаговой иммуортализации первичных клеток эпителия человека с помощью одновременного введения кДНК *hTERT* и антиРНК *CDKN2A* локуса, не используя вирусные онкопротеины. При этом они показали стабильность теломер и генома. Ген *CDKN2A* кодирует p16^{INK4A} и p14^{ARF}. p14^{ARF} активирует работу супрессора p53. Таким образом, с помощью этого метода им удалось

снизить работу p53 и Rb, но при этом их функция частично сохранялась, что является важным для нормального функционирования клеток (Smith et al., 2016).

Несколько других линии immortalized кератиноцитов были получены путем введения онкогенов папилломавируса человека HPV. Иногда клетки после таких изменений могут давать начало ненормальным структурированным предраковым эпителиальным тканям с нерегулярной пролиферацией, теряется терминальная дифференцировка, которая иногда указывает на злокачественные конверсии, связанные с инвазией в коллагеновый гель (Oda et al., 1996; Schoop et al., 1999). Все трансдуцированные с помощью десяти типов HPV (включая HPV16/18/31/33/35/45/51/59/66/70 E6E7) кератиноциты показали увеличенное число разрывов двухцепочечной ДНК по сравнению с контролем, а повышение экспрессии *hTERT* наблюдается только в клетках, которые прошли предшествующий кризисный период. В результате HPV-индуцированной immortalization возникает количество хромосомных aberrаций обратно пропорциональное способности вируса к immortalization (Schütze et al., 2016).

2.1.3 Эквиваленты кожи

Культивируемые *in vitro* 3D-эквиваленты кожи человека и эпидермальные эквиваленты человека (также известные как органотипические модели кожи) в настоящее время часто используются для исследований в области клеточной биологии, тканевой инженерии, дерматологии и токсикологии. Эти 3D-модели кожи предпочтительнее обычных монослойных культур, поскольку они точно имитируют эпидермис *in vivo* и барьерную функцию кожи и, таким образом, служат полезным дополнением к экспериментальному тестированию на животных. Живые кожные эквиваленты, состоящие из коллагенового геля, заселенного фибробластами, способны обеспечить соответствующий субстрат для развития поляризованного многослойного эпителия, обладающего

морфологическими и функциональными качествами нативного эпидермиса. Такие модели искусственной кожи широко используются для изучения генодерматозов, экспрессии эпидермальных генов, эпидермально-дермальных взаимодействий и заживления ран (Schoop et al., 1999).

Для удовлетворения растущего спроса на эти 3D органотипические культуры кожи человека *in vitro* требуются большие количества первичных кератиноцитов. Первичные кератиноциты человека предпочтительно выделяют из кожи взрослого человека, полученной во время пластической операции (например, при сокращении брюшной стенки или груди). К сожалению, доступность донорской кожи ограничена, а короткая продолжительность жизни *in vitro* и междонорная вариабельность являются недостатками использования первичных кератиноцитов человека. Таким образом, иммортализованные клеточные линии кератиноцитов могут обеспечить неограниченный источник клеток и решение вышеупомянутых проблем (Smits et al., 2017).

2.1.4 *Bmi-1*, *c-Myc*

Одним из важнейших генов, продукты которого обнаруживаются в иммортализованных клетках, является *Bmi-1* (B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1), который первоначально относится к онкогенам. Это связано с тем, что он активно экспрессируется в раковых клетках (W. L. Liu et al., 2010; Zhu et al., 2016). *Bmi-1* является репрессором транскрипции, входит в семейство белков PcG (Polycomb-group) – эпигенетических регуляторов, ответственных за формирование осей, гемопоэз, регуляцию пролиферации и старение и которые работают посредством ремоделирования хроматина (Lanzuolo, Orlando, 2012; Liu et al., 2010). PcG определяют открытое либо закрытое состояние генов, а также ответственны за инактивацию X-хромосомы. Они являются активными только при раннем развитии организма и в иммортализованных клетках (Pirrotta, 1998). Конкретнее, *Bmi-1* входит в состав

PRC1 (Polycomb repressive complex(es) of type I) комплекса, который представляет собой убиквитин-лигазу гистона H2A E3 (Vidal, Starowicz, 2017).

Этот ген является кооператором гена *c-Myc*. В нём есть специальный домен на NH2 конце, который взаимодействует с *c-Myc* и регулирует клеточную пролиферацию (Alkema et al., 1997). Известно, что *Vmi-1* ингибирует проапоптотические функции *c-Myc* (J. J. Jacobs et al., 1999).

Оверэкспрессия *Vmi-1* приводит к активации теломеразы обратной транскриптазы человека hTERT и индуцирует работу теломеразы в иммортализованных эпителиальных клетках млекопитающих. Индукция теломеразы способствует продлению реплицирующего жизненного цикла и иммортализацию. Также недавно было показано что оверэкспрессия *Vmi-1* увеличивает длительность репликации фибробластов человека, но не приводит к их иммортализации, то есть этот ген не может активировать теломеразу в фибробластах, в отличие от *c-Myc* (Dimri et al., 2002; J. L. Jacobs et al, 1999). Индуцирование теломеразы с помощью *Vmi-1* зависит от типа клеток или от механизма запуска. Так, Димри и другие выяснили, что клеточная культура MECs становится иммортализованной при оверэкспрессии *Vmi-1* только после ранее активированного гена *hTERT*. *Vmi-1* связывается с промотером *hTERT* и активирует транскрипцию (Рис.2) (Dimri et al., 2002).

В исследованиях Дэн Чжу и др. обнаружилась высокая экспрессия *Vmi-1* в иммортализованных клетках культуры карциномы носоглотки (NPC), но не в исходной первичной культуре этих клеток. Тот же самый результат показала экспрессия *c-Myc*. Также у более поздних пассажей иммортализованных клеток повышается экспрессия гена, что может свидетельствовать о селективном преимуществе роста клеток, экспрессирующих *Vmi-1*. Но если включить повышенную экспрессию этого гена в первичных NPC, то эти клетки станут иммортализованными. Ученые предполагают, что *Vmi-1* вместе с *c-Myc* – одни из сигналов вышележащих этапов активации, ведущие к активации основного

индуктора поддержания иммортализации NF-kB – белка, останавливающего апоптоз опухолевых клеток (Zhu et al., 2016).

Также Vmi-1 инактивирует путь pRB/p16^{INK4a}, что также способствует иммортализации (Eva et al, 2014). Таким образом, Vmi-1 подавляет p53 зависимый апоптоз, что было подтверждено Алажез и другими на культуре опухолевых клеток NPC. Это способствует выживаемости клеток в ответ на радиацию. Уменьшение белка Vmi-1 приводит к повышенному фосфорилированию гистонов H2AX. Эти гистоны снимаются с молекулы ДНК при её двуниговом разрыве после радиации, и это открывает возможность для репарации, но фосфорилирование препятствует этому (Alajez et al., 2009; Zhu et al., 2016).

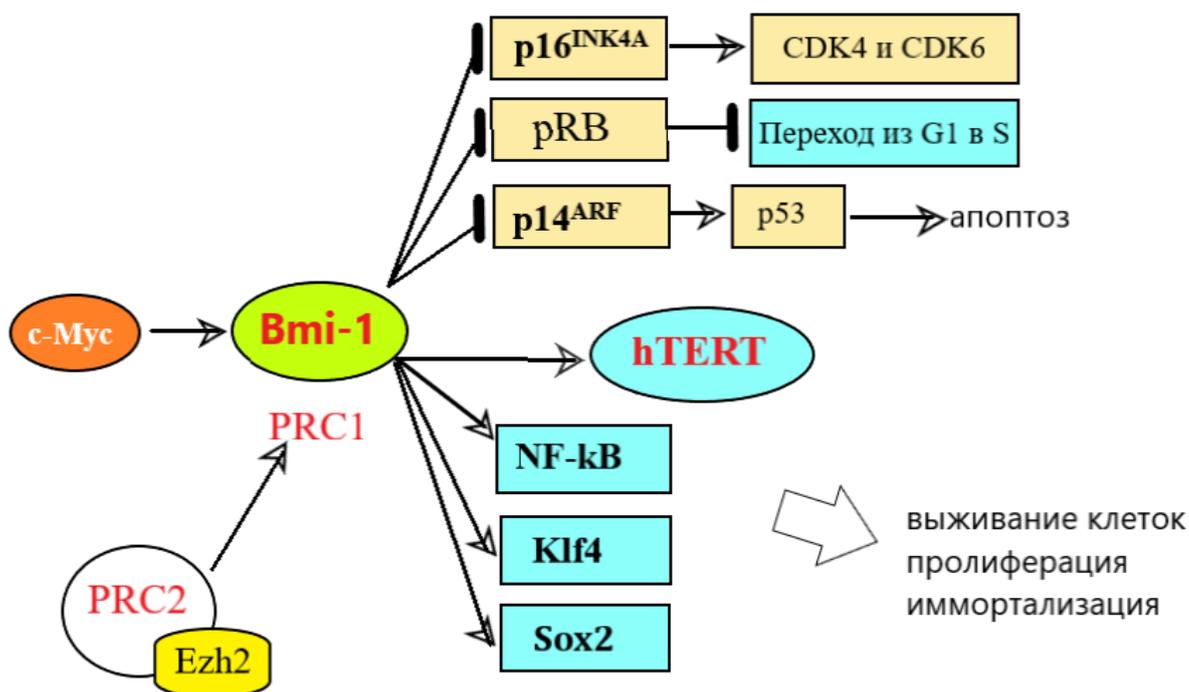


Рисунок 2. Схема основных восходящих и нисходящих сигнальных путей Vmi-1, приводящих к иммортализации.

Показано, что c-Myc может приводить к бессмертию эпителиальных клеток человека. При эктопической экспрессии c-Myc увеличивается

продолжительность жизни фибробластов, что объясняется активацией транскрипции *hTERT* (см выше). Также было показано, что *c-Myc* способствует увеличению пролиферации клеток в присутствии $pRB/p16^{INK4a}$. Это связано с тем, что *c-Myc* сам способен снижать действие этого гена. Но интересно, что, несмотря на первоначальное влияние *c-Myc* на увеличение продолжительности жизни фибробластов, последствия экспрессии этого гена могут зависеть от дальнейших условий. Например, *c-Myc* в кератиноцитах в дальнейшем вызывает их дифференцировку, а в некоторых штаммах фибробластов это приводило к преждевременному старению. По всей видимости, это зависит от уровня активации $pRB/p16^{INK4a}$ и степени подверженности клеток стрессу. В итоге работа Джил и соавторов доказывает, что только повышенная экспрессия *c-Myc* может привести к полной бессмертности нормальных эпителиальных клеток (Gil et al., 2005).

c-Myc может заменять критическую функцию онкогенов *E6* в клеточной иммортализации, и подобно *E6*, *c-Myc* взаимодействует с *E7*, что ведет к эффективной иммортализации кератиноцитов *in vitro*. Кератиноциты, иммортализованные *E6* + *E7*, приводят к низкому уровню *p53* в отличие от иммортализации с помощью *c-Myc* + *E7*, когда в кератиноцитах экспрессируется достаточно высокий уровень *p53*. Изолированная сверхэкспрессия *c-Myc* индуцирует апоптоз, но антиапоптотическая активность *E7* делает этот эффект противоположным, тем самым продолжая клеточную пролиферацию (Dakic et al., 2016; X. Liu et al, 2007).

Также для иммортализации кератиноцитов возможно использовать повышение экспрессии *c-Myc* и ингибирование пути *Rho/ROCK*. *Rho/ROCK* путь регулирует множество клеточных процессов, включая клеточную полярность, подвижность, пролиферацию и апоптоз, а также контролирует сборку актинового цитоскелета, сократительную способность клетки, что, как следствие такой деятельности, влияет на сигналы каскад, клеточный апоптоз. Если использовать ингибитор *ROCK* (*Y-27632*), то это увеличит

долгосрочность пролиферации без нарушения генома линии клеток и дифференцировочного потенциала. Этот процесс был назван условным перепрограммированием, и сильно зависит от нарушения деятельности ROCK. В этом механизме иммортализации есть сходство работы с предыдущим с-Мус + E7 (Dakic et al., 2016).

2.1.5 p63

p63 – фактор транскрипции, является главным регулятором эмбрионального развития эпидермы. Он кодируется геном *TP63*, относящемуся к семейству генов *p53*. Фактор имеет несколько изоформ, каждая из которых играет определенную роль в различных клетках и тканях, к примеру, таких как эпидермис, яйцеклетки, мышцы. Основные изоформы, играющие важную роль в эпидермисе: трансактивирующие доменосодержащие изоформы TAp63 α и TAp63 γ (Sandilands et al, 2009).

Во время эмбриогенеза p63 может являться молекулярным переключателем, который запускает разделение клеток эпидермиса на слои. Таким образом, p63 запускает программу стратификации (Koster, Roop, 2004).

Мутации p63 приводят к заболеваниям развития человека, и хотя он экспрессируется в ряде тканей, происходящих из различных зародышевых слоев, нарушения экспрессии этого фактора до сих пор ассоциируются только с эктодермальными нарушениями, то есть приводят к кожным аномалиям (Rinne et al, 2007). К примеру, полная делеция *TP63* у мышей приводит к отсутствию эпидермиса в принципе и также связанных с ним структур (Fessing et al., 2011; Soares, Zhou, 2018).

Молекулярная и клеточная роль p63 очень важна в пролиферации и дифференцировке кератиноцитов. Его экспрессия наблюдается в основном в базальном слое эпидермиса. Более высокий уровень экспрессии *TP63* обнаружен в более активно делящихся клетках, таких как голоклоны. Выключение *TP63* в первичных кератиноцитах приводит к гипоплазии,

гипопролиферации, остановке клеточного цикла и к нарушению клеточной адгезии (Soares, Zhou, 2018).

p63 функционирует для поддержания пролиферации, дифференцировки и адгезии кератиноцитов в регенерирующем эпидермисе. Также недавние исследования показали, что p63 играет роль в модуляции хроматина в кератиноцитах через контроль Satb1, ремодулятора хроматина, таким образом он вносит свой вклад в морфогенез эпидермиса путем установления тканеспецифической организации хроматина и экспрессии генов в эпидермальных клетках-предшественниках (Soares, Zhou, 2018).

Низкая экспрессия p63 препятствует образованию 2D и 3D моделей дифференцировки кератиноцитов. Устойчивая экспрессия p63 необходима для поддержания способности нормальных постнатальных кератиноцитов формировать дифференцированный стратифицированный эпителий. При подавлении действия некоторых изоформ p63 существенно изменяется экспрессия некоторых генов кератиноцитов в процессе регенерации, нужных для дифференцировки клеток: структурные белки кератин 1 и 10, лорикрин, десмоглеин 1 и десмоколлин 1, ферменты, в том числе трансглутаминаза 1. Неспособность этих клеток инициировать программу дифференцировки эпидермиса в отсутствие p63 предполагает центральную роль p63 в поддержании судьбы эпидермальной ткани постнатально (Truong et al, 2006).

2.1.6 Супрессоры метастазирования

Супрессоры метастазирования определяются их способностью блокировать метастазирование на любой стадии метастатического каскада, практически не влияя на первичный рост опухоли. Метастазирование – процесс образования вторичных очагов опухолевого роста (метастазов) в результате распространения клеток из первичного очага в другие ткани. Это сложный процесс, который является основной причиной смерти онкологических больных. Гены-супрессоры метастазов нацелены на MAPK, G-белок-связанный

рецептор, клеточную адгезию, цитоскелетные, транскрипционные регуляторные и метастазирующие пути восприимчивости (Khan, Steeg, 2018).

Многие исследования уже давно доказали сильное эпигенетическое влияние на регулирование экспрессии генов ДНК, в том числе с помощью метилирования и модификации гистонов. Нарушение этих процессов происходит в опухолевых клетках. **Ezh2** (Enhancer of zeste homolog 2) – является основной ферментативной субъединицей эпигенетического комплекса молчащих генов, который называется PRC2. Комплекс PRC2 вызывает репрессию транскрипции путём метилирования гистонов и негистоновых белков; работа этого комплекса повышает активность другого комплекса PRC1, в состав которого входит Bmi-1 (Vidal, Starowicz, 2017). Ezh2 – лизинметилтрансфераза, предпочтительно катализирует метилирование лизина 27 гистона 3 (H3K27) – репрессивный маркер, который эпигенетически репрессирует экспрессию генов; является активным только в связанном состоянии с другими компонентами PRC2. PRC – поликомб-репрессивные комплексы, могут быть двух типов 1 и 2, которые ответственны за эмбриональное развитие и за решение судеб клеток. Основными компонентами PRC2 являются Ezh2, Suz12 и EED (Embryonic Ectoderm Development) (Kim et al., 2013).

Ezh2 участвует в поддержании нормальных и неопластических стволовых клеток. Его активность повышена в опухолевых клетках. Ezh2 подавляет множество генов, кодирующих факторы регуляторов контрольных точек пролиферации, что, возможно, приводит к выживаемости опухолевых клеток или просто является тонким «настройщиком» эпигенетического молчащего механизма во всех клетках. Если использовать высоко селективные ингибиторы Ezh2, то это приведет к остановке клеточной пролиферации и к апоптозу (Gan et al., 2018)

Ezh2 способствует образованию опухолей путем изменения экспрессии многочисленных опухолевых супрессоров. Он приводит к включению

маркерных молекулярных процессов всех опухолей, таких как активация NF-κB, выключение работы микроРНК, иммунное уклонение опухолей и включает неканонические пути транскрипции (Рис.3) (Gan et al., 2018).

Ezh2 запускает путь NF-κB. Накопленные после деятельности комплекса PRC2 метилированные H3K27 гистоны являются отрицательными регуляторами NF-κB-киназы. Однако, эпигенетический путь NF-κB может быть ингибирован ингибированием Ezh2 (Yamagishi, Uchamaru, 2017).

Некоторые микроРНК с помощью специфического связывания с Ezh2 могут регулировать экспрессию этого гена через изменение стабильности мРНК и регуляцию трансляции. К примеру, микроРНК 26a и 101 снижают экспрессию *Ezh2*. При определенных типах рака снижается регуляция этих микроРНК, и это приводит к сверхэкспрессии *Ezh2* (Рис.3) (Yamagishi, Uchamaru, 2017).

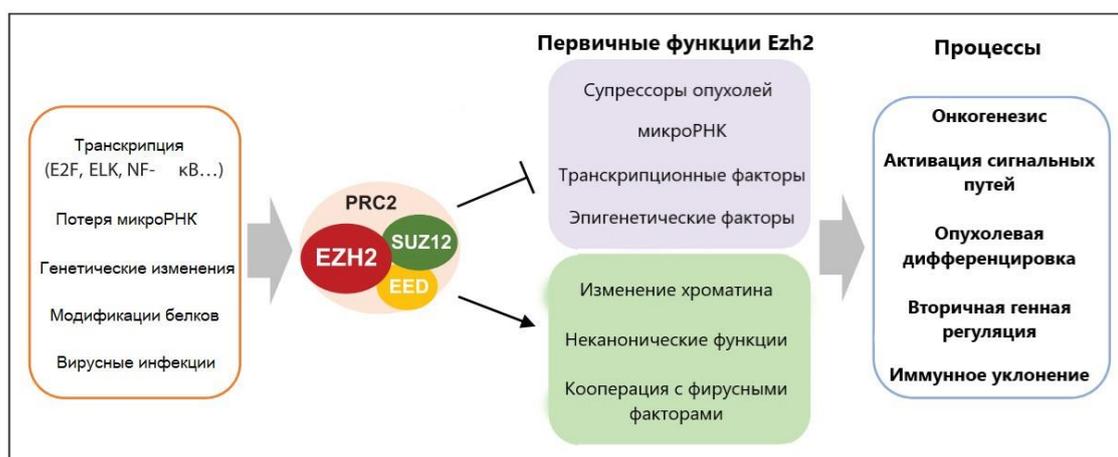


Рисунок 3. Онкогенетические процессы, связанные с работой Ezh2, входящего в состав PRC2 помимо Suz12 и EED. Несколько онкогенов активируют экспрессию Ezh2 и запускают его ферментативную активность. Активированный Ezh2 обычно работает как супрессор определенных целевых генов, таких как компоненты PRC2 комплекс (Yamagishi, Uchamaru, 2017).

Ezh2 регулирует клеточный цикл, дифференцировку, эпителиально-мезенхимальные переходы клеток и другие типоспецифические характеристики рака. Кроме того, как было сказано выше, возникает иммунитет опухоли, причиной чего служит подавление продукции опухолевых хемокинов T-

хелперов CXCL9 и CXCL10 с помощью комплекса PRC2, который также влияет на транспорт эффекторных Т-клеток к опухоли. Ингибиторы Ezh2 увеличивают продукцию CXCL9 и CXCL10 и улучшают устранение опухоли (Yamagishi, Uchimaru, 2017).

Ezh2 в комплексе PRC2 важен для предимплантационного развития некоторых млекопитающих: экспрессия Ezh2 со стороны материнского генома сопровождается соответственно изменением уровня гистонов H3K27me3. Низкое содержание Ezh2 ведет к нарушению эмбрионального развития на стадии бластоцисты и нарушает равновесие между H3K27me3 и H3K4me3 гистонами (Cai et al., 2019).

Фосфорилирование Ezh2 повышает его активность, что способствует пролиферации клеток, опухолевому развитию. Фосфорилированный Ezh2 также активирует STAT3 через его метилирование (Yamagishi, Uchimaru, 2017). Ким и другие показали, что в стволовых клетках человека повышено содержание ассоциированных EZH2 и STAT3, и что их взаимодействие снижается с дифференцировкой клеток (Kim et al., 2013). STAT3 контролирует множество генов, ответственных за ряд центральных процессов. Семейство STAT, или сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции, всегда присутствуют в любых клетках. Они активируются фосфорилированием, способны димеризоваться с помощью Src-киназы. Димеры STAT затем перемещаются в ядро, где способны связаться с последовательностями из девяти пар оснований в регуляторной области генов-мишеней, таким образом регулируя транскрипцию. STAT белки запускаются с помощью интерферонов и цитокинов, которые связываются с рецепторами и запускают действие тирозинкиназ (к примеру, Jak, Src) (Frank, 2007).

STAT1 является ключевым медиатором действия интерферонов, активируется на множество стимулов. STAT3 способствует выживанию и пролиферации клеток. Одни из ключевых генов, запускаемых STAT3, являются *SOCS*, *c-Myc*, *Klf4*, *Bcl*, *VEGF* и другие (Frank, 2007).

Активация STAT3 в клетках может приводить к работе генов, способствующих иммортализации фибробластов, но не опухоли, то есть способствует возникновению неопластического поведения. Активация STAT3 приводит к активации примерно 100 генов мишеней в фибробластах, правда только некоторые из них способны приводить к возникновению опухолей (Frank, 2007). В целом, активация STAT3 всегда происходит при трансформации фибробластов, для PDGF-индуцированной пролиферации фибробластов, и активация целевого гена *c-Myc* достаточна для запуска этого процесса (Alvarez, Frank, 2004).

ITIN5 (ингибитор-интер- α -трипсина) – это ингибитор сериновых протеаз, которые являются регуляторами различных острых фазовых процессов, представлен в человеческой коже и синтезируется преимущественно фибробластами. Этот ген продуцируется в нормальной коже, и показано, что при воспалительных заболеваниях экспрессия *ITIN5* значительно повышается (Sasaki et al., 2017).

ITIN-белки состоят из субъединиц тяжелых и легких цепей, они включают общую легкую цепь протеогликана сульфата хондроитина, бикунин и переменный набор из двух гомологичных тяжелых цепей (IT1 тяжелые цепи, ITIN). Бикунин играет важную роль не только в защите от повреждения органа при тяжелом воспалении, но и в ингибировании инвазии опухоли и метастазирования. IT1 участвуют в стабилизации внеклеточного матрикса и в предотвращении метастазирования опухоли. Они также структурно связаны с ингибиторами сериновых протеаз плазмы и состоят из легкой цепи и различного количества тяжелых цепей. Альтернативный сплайсинг приводит к появлению нескольких вариантов транскрипта (Sasaki et al., 2017).

Известно, что внеклеточный матрикс поддерживает целостность эпителия. В канцерогенезе деградация матрикса запускает метастазирование, контролируя миграцию и дифференцировку, включая программы раковых

стволовых клеток. ITIH5 может контролировать механизмы снижения роста раковых клеток независимо от данного подтипа опухоли, стабилизируя внеклеточный матрикс (Rose et al., 2017).

Экспрессия *ITIH5* также связана с регуляцией генов, участвующих в клеточной адгезии и клеточной дифференцировке. Он способен изменять состав матрикса, к примеру, повышением содержания коллагена IV типа в базальной мембране, повышать содержание поверхностных рецепторов интегринов, которые связываются с базальной мембраной, участвуя в клеточной адгезии и миграции. Интегрины регулируют нисходящую сигнализацию, и вполне вероятно, что они оказывают совершенно разное влияние на поведение раковых клеток, в зависимости от того, какие интегриновые рецепторы и лиганды подвергаются воздействию (Huvneers, Danen, 2009; Rose et al., 2017).

2.1.7 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

В 2006 году профессору Яманака удалось найти определенный набор транскрипционных факторов, с помощью введения которых в соматические клетки возможно индуцирование плюрипотентного состояния. Такие клетки были названы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). В результате эксперимента было установлено, что комбинация факторов Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4 необходима и достаточна для индукции плюрипотентного состояния. Также другой группой ученых было выяснено наличие другой возможной комбинации факторов для ИПСК: Oct4, Sox2, Nanog и Lin-28 (Takahashi, Yamanaka, 2006; Некрасов, 2011)

Такие клетки имеют нормальный кариотип, их получение не требует использование человеческих бластоцист, экспрессируют маркеры плюрипотентности. Клетки, по сути, являются иммортализованной культурой, как и любые стволовые клетки; могут дифференцироваться под действием определенных факторов в различные клетки организма.

Благодаря возможности получения ИПСК практически от любого пациента, с помощью этой культуры можно создавать модели любых клеточных заболеваний. Способность ИПСК бесконечно пролиферировать и дифференцироваться *in vitro* в детерминированных условиях позволяет такие модели стандартизировать и автоматизировать (Некрасов, 2011).

Задача Oct4, Sox2, Klf4 и Nanog – поддержание плюрипотентности. Oct4, Sox2 и Nanog положительно регулируют транскрипцию всех белков плюрипотентной схемы в пути LIF (Novak et al., 2019). **Oct4** высоко экспрессируется в плюрипотентных эмбриональных клетках, а также в клетках зародышевой линии, и его экспрессия быстро снижается при дифференцировке. При отсутствии Oct4 эмбрионы погибают в момент имплантации. Таким образом, Oct4 считается главным регулятором для инициации и поддержания плюрипотентных клеток во время эмбрионального развития. Широко используется как маркер для недифференцированных клеток (Shi, Jin, 2010). **Sox2** (sex-determining region Y (SRY) box 2) экспрессируется уже очень рано в эмбриональном развитии и играет существенную роль в возникновении плюрипотентной внутренней клеточной массы на ранних стадиях эмбрионального развития, поскольку его отсутствие приводит к эмбриональной летальности. Sox2 связывается с ДНК вместе с Oct4 для активации транскрипции ключевых факторов плюрипотентности (Novak et al., 2019). **Klf4** (Kruppel-like factor 4) наравне с Oct4, Sox2 и c-Myc необходим для эпигенетического перепрограммирования соматического генома, важен для эпителиально-мезенхимальных переходов в эмбриогенезе; участвует в регуляции пролиферации и дифференцировки. Вероятно, сайт узнавания Klf4 присутствует в промоторе ферментативной субъединицы теломеразы. Может взаимодействовать с c-Myc и работать как онкоген, провоцируя у взрослых мышей дисплазию кожи и плоскоклеточный рак, так как способен подавлять p53. Но в то же время Klf4 может действовать как супрессор опухоли, активируя ингибитор гена *p21* (Tiwari et al., 2013). **Nanog** – гомеобокс-

доменный белок, впервые обнаруженный в эмбриональных стволовых клетках с каноническими функциями в транскрипционной регуляции самообновления и плюрипотентности. Пониженная регуляция индуцирует дифференцировку эмбриональных СК и у человека, и у мыши, таким образом, определяя судьбу плюрипотентных клеток (Gong et al., 2015).

2.2 Клеточный состав эпидермиса.

Кожа является наибольшим по величине органом в человеческом организме и играет важную функцию барьера. Кожа состоит из двух основных слоев: дермы и эпидермиса. Эпидермис человека - это многослойный ороговевающий эпителий, который образуется благодаря высоко скоординированному процессу дифференцировки, приводящему к образованию слоев мертвых клеток, образующих защитный покров (Driskell, Watt, 2015).

Эпидермис в своем клеточном составе включает в себя кератиноциты, фибробласты, меланоциты и клетки Лангерганса. Меланоциты – клетки, несущие пигмент меланин, имеют разветвленное строение, тело лежит в базальном слое эпидермиса, а длинные отростки уходят в шиповатый слой; основная функция заключается в защите от ультрафиолетового излучения (Быков, 2011). Клетки Лангерганса – это специализированные дендритные клетки, которые входят в состав эпидермиса преимущественно в базальном и шиповатом слоях, где захватывают антигены (Merad et al, 2008). Фибробласты – мезенхимальные отростчатые клетки, способные синтезировать внеклеточный матрикс (Driskell, Watt, 2015).

Наиболее распространенный тип клеток эпидермиса – кератиноциты, составляющие около 95% клеточной массы (Barker et al., 1991). Основная функция кератиноцитов заключается в обеспечении структурной целостности эпидермиса, тем самым поддерживая механический барьер для внешнего мира. Кроме того, кератиноциты играют важную роль в инициации, поддержании и регуляции эпидермальных иммунных реакций, являясь частью врожденной

иммунной системы, быстро и неспецифично реагирующей на антигенные стимулы (Johansen, 2017).

Помимо данных типов клеток в эпидермисе находятся эпидермальные стволовые клетки, способствующие ежемесячному обновлению слоев и заживлению ран человека. Подробнее об этих клетках, а также о кератиноцитах и фибробластах ниже.

2.2.1 Стволовые клетки эпидермиса

Ежемесячное обновление и своевременное восстановление эпидермиса человека поддерживается за счет эпидермальных стволовых клеток, которые генерируют колонеобразующие клетки. Эти клетки неоднородны по своей способности к устойчивому росту. При клонировании первичных культур нормальных клеток образуются три типа колоний, называемых *голоклонами*, *мероклонами* и *параклонами*. Считается, что эти колонии происходят из стволовых клеток, транзиторно-амплифицирующих клеток и дифференцированных клеток соответственно (Beaver et al, 2014). Голоклоны обладают наибольшей репродуктивной способностью, и в стандартных условиях менее 5% клеток, образованных голоклонами, окончательно дифференцируются (Pellegrini et al., 2001). Эпителиальные культуры, содержащие голоклонообразующие клетки, могут постоянно восстанавливать массивные дефекты кожи. Голоклоны способны продуцировать мероклоно- и параклонообразующие клетки, которые являются транзиторными амплифицирующими прогениторами. Это другие два типа колонеобразующих клеток. Параклоны – это клетки с короткой реплицирующей продолжительностью жизни (не более 15 поколений), в результате клетки полностью дифференцируются. Третий тип, мероклоны, являются смесью клеток с различным потенциалом роста. Они являются переходной стадией между голоклонами и параклонами (Barrandon, Green, 1987).

Частота встречаемости различных типов эпидермальных колониеобразующих клеток зависит от возраста, то есть старения, так как клетки от более старых доноров дают более низкую долю голоклонов и более высокую долю параклонов (Barrandon, Green, 1987).

Специфика голоклонов также заключается в том, что они способны экспрессировать гены выживания и самообновления, как и у стволовых клеток, такие как *p63* и *Bmi-1* (Claudino et al, 2005; Pellegrini et al., 2001). Пеллегрини и соавторы показали методом иммуногистохимического окрашивания *p63*-специфическими mAb, что голоклоны располагаются исключительно в базальных слоях эпидермиса и являются отдельными одиночными клетками (Рис. 4) (Pellegrini et al., 2001). Также помимо этих двух генов в голоклонах экспрессируются маркеры стволовых клеток CD44, $\alpha 2\beta 1$ интегрин и Oct4. Мероклоны содержат примерно столько же белков CD44, *Bmi-1*, Oct4, но меньше интегрин $\alpha 2\beta 1$. Параклоны отрицательны по интегрину $\alpha 2\beta 1$, *Bmi-1* и Oct4 и содержат меньше CD44 положительных клеток, чем голо- и мероклоны (Beaver et al., 2014).

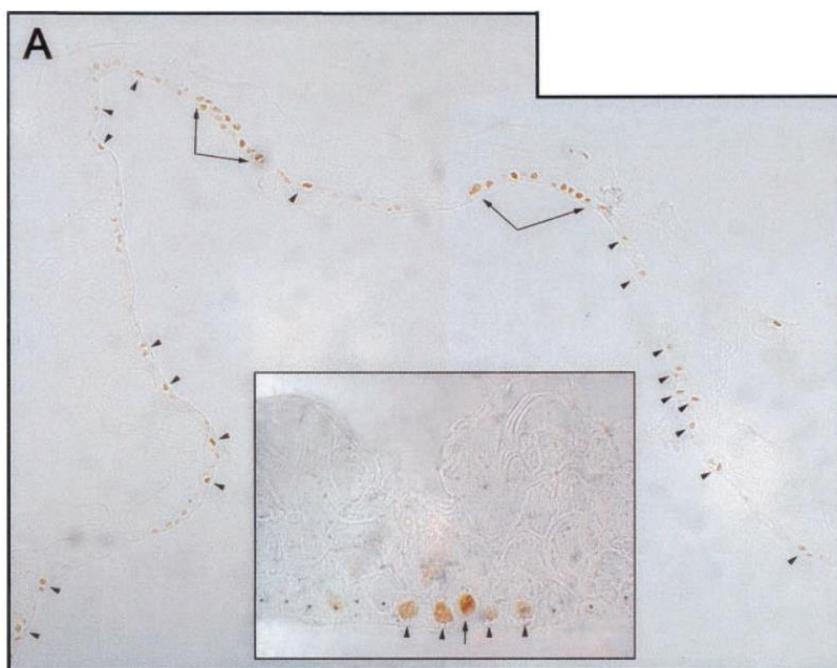


Рисунок 4. Экспрессия *p63* в стволовых клетках эпидермиса человека: срез эпидермального слоя, окрашенный *p63*-специфическими mAb. $p63^+$ -клетки расположены единично (указаны стрелками) у базального слоя, и раздереы между собой $p63^-$ -клетками. (Pellegrini et al., 2001)

Из работы Бивера 2014 года известно, что голоклоны и мероклоны в целом производят примерно одинаковое количество вторичных колоний, а параклоны производят мало или вообще не производят. При этом различие между голоклонами и мероклонами заключается в количестве произведенных вторичных голоклонов. Голоклоны производят главным образом только голоклонов, в то время как мероклоны производят преимущественно мероклонов, но и некоторое количество вторичных колоний голоклонов, что является немного парадоксальным. Это предполагает, что колонии от транзитно-амплифицирующих клеток могут производить колонии стволовых клеток. Значит, что голоклоны и мероклоны различаются только по доле произведенных стволовых клеток. Также, голоклоны и мероклоны способны вызывать образование опухоли после подкожной трансплантации клеток мышам. При этом опухоль, образованная голоклонами, имеет меньшую латентность и имеет большую размерность (Beaver et al., 2014).

2.2.2 Закладка эпителия: участие эпителиально-мезенхимальных и мезенхимально-эпителиальных переходов.

Ткани позвоночных традиционно делятся на две основные категории: 1) эпителиальные ткани эктодермального или энтодермального происхождения с небольшим количеством межклеточных веществ, и 2) мезенхимальные ткани мезодермального происхождения с большим количеством внеклеточного вещества. Однако различия между этими двумя категориями не столь резкие, и в организме могут происходить переходы клеток между данными двумя типами (Bragulla, Nombberger, 2009). Мезенхимально-эпителиальные переходы (МЭП) являются важными механизмами в различных стадиях морфогенеза и органогенеза, включая и процессы регенерации. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) включает в себя потерю полярности эпителиальных клеток, изменение цитоскелета, формирование мигрирующего фенотипа. МЭП задействован для формирования эпителия на различных

стадиях развития, во время которого клетки устанавливают апикально-базальную полярность, образуются межклеточные контакты, возникают рецепторы, связанные с полярностью клеток (Pei et al., 2019).

МЭП – это фундаментальный процесс в гистогенезе для появления мезенхимальных клеток. При отсутствии МЭП невозможна гастрюляция эмбрионов и последующее оформление тела. ЭМП представляет собой превращение эпителиальных клеток в удлиненные клетки с мезенхимальным фенотипом, что может происходить при физиологических и паталогических процессах. В клетках увеличивается миграционная способность и повышается устойчивость к апоптозу (Gurzu, 2015).

Эмбриональные стволовые клетки и ИПСК подвергаются ЭМП и МЭП для дифференцировки в соматические типы клеток, и точно также дифференцированные клетки могут быть перепрограммированы в плюрипотентные посредством последовательных ЭМП-МЭП, причем МЭП является критическим шагом для приобретения плюрипотентности (Pei et al., 2019).

Рассмотрим проявление переходов на примере мыши (Рис.5). Формирование первого эпителия у мышиноного эмбриона происходит через МЭП. На стадии E2.5 бластомеры усиливают свои межклеточные контакты за счет уплотнения, что является первой стадией МЭП. Это важный момент при формировании трофоэктодермы, которая отделяется снаружи на 32-клеточной стадии при МЭП. К E3.75 трофоэктодерма полностью поляризуется в эпителиальную структуру с функциональными плотными соединениями, которые позволяют образовать первую полость (бластоцель). Трофоэктодерма синтезирует базальную мембрану, отделяясь от внутриклеточной массы (ВКМ). Примитивная энтодерма также участвует в синтезе базальной мембраны. Позже на стадии E4.5 энтодерма расширяется вдоль трофоэктодермы и подвергается частичной ЭМП на переднем крае. Муральная и париетальная энтодерма отделены друг от друга базальной мембраной. К E4.75 клетки ВКМ начинают

реорганизовывать свои межклеточные контакты, приобретая апикобазальную полярность (контакт базальной мембраны с $\beta 1$ -интегринами). МЭП завершается после E5.0, а на этапе E5.25 и во внезародышевой эктодерме. В апикальном домене остается небольшая полость, которая будет сливаться с просветом экстраэмбриональной эктодермы, в результате образуя амниотическую полость на стадии цилиндра (Pei et al., 2019).

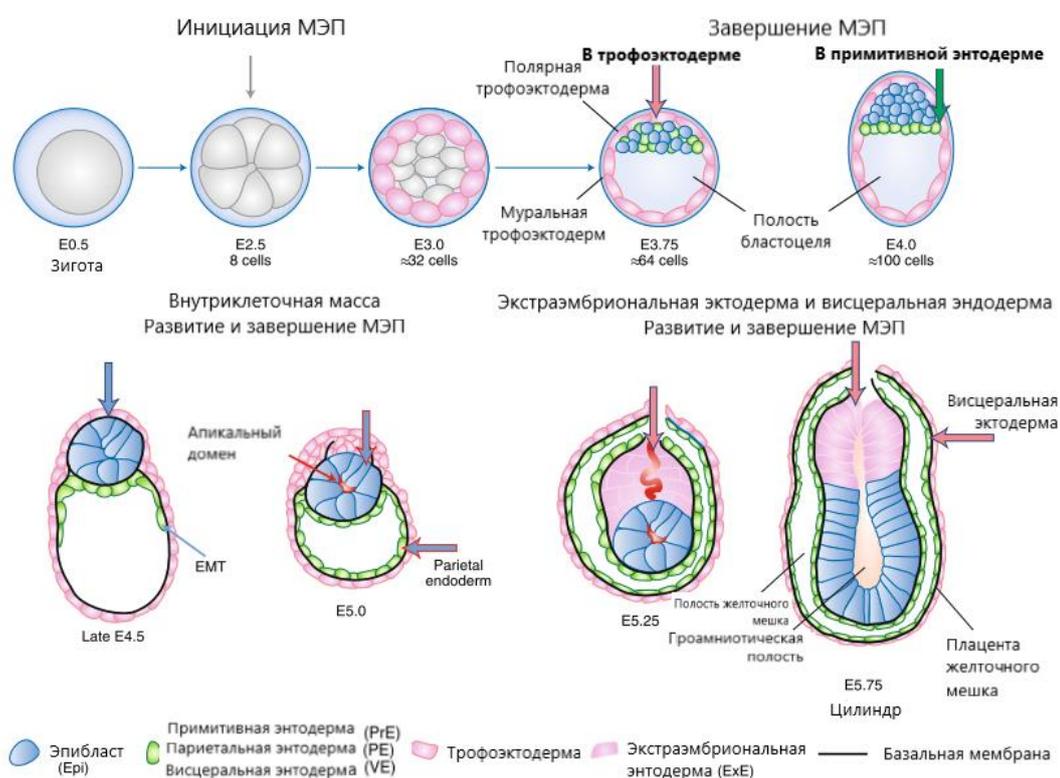


Рисунок 5. Формирование эпителия у мышиноного эмбриона через МЭП (описание в тексте). ВКМ изображено синего цвета. Крупные цветные стрелки указывают на время инициации или завершения МЭП в различных слоях клеток. (Pei et al., 2019)

Аналогичные проявления переходов наблюдаются при карциномах и некоторых мезенхимальных опухолях. У таких клеток возникает способность к миграции и инвазии, то есть к ЭМП. Проявляются признаки мезенхимальных клеток, часто повышается экспрессия E-кадгерина. Также, известно большое влияние на инвазию клеток опухоли семейства miR-200: снижение экспрессии некоторых представителей данного семейства может приводить к супрессии

клеточной инвазии и миграции, но при этом повышать клеточную пролиферацию. Семейство miR-200 может взаимодействовать с геном *p53* (Gurzu, 2015). Наиболее важный член семейства miR-200с, участвующий в ЭМП и метастатическом процессе карцином, оказывает отрицательную регуляцию своих генных мишеней ZEB1, ETS1 и FLT1, которые могут напрямую подавлять экспрессию E-кадгерина (Hur et al., 2013).

Иногда при МЭП вместе со всеми клеточными изменениями наблюдается повышение экспрессии некоторых неспецифичных для мезенхимальных клеток маркеров, например, таких как кератины 5, 6, 14, 20. Повышение экспрессии данных генов наблюдают часто при карциномах, в том числе при уротелиальной карциноме, метапластической карциноме молочной железы, плоскоклеточной карциноме (Condorelli et al., 2019; Jangir et al., 2019; Rito et al., 2014).

2.2.3 Кератинизация. Маркерные белки

Кератиноциты эпидермиса человека по мере деления митозом и продвижения в верхние слои подвергаются дифференцировке. Общие изменения, которые происходят в клетках, представляют собой уплощение клеток, накопление макрофибрилл, обезвоживание (70%), и в результате исчезновение ядра и органелл, разрушение филаггрина.

Кератиноциты находятся на разных стадиях дифференцировки и организованы в разные слои в зависимости от стадии развития: базальный, шиповатый, гранулярный и роговой слой. Митозы преимущественно происходят в базальном слое, а клетки, покидающие этот слой, входят в процесс дифференцировки, или кератинизации, увеличиваясь в размере и синтезируя специализированные молекулы, маркеры, проходя через различные слои эпидермиса. Терминальная дифференцировка кератиноцитов эпидермиса приводит к образованию плотно упакованного липидно-белкового матрикса, который образует непроницаемый барьер – роговой слой (Рис.6) (Sandilands et

al., 2009). Клетки соединены между собой десмосомами и межклеточными контактами, что поддерживает прочность и осуществляет передачу сигналов и веществ между клетками. Основная функция кератиноцитов является поддержание структурной целостности эпидермиса и препятствие проникновению инфекций, посредством создания барьера (Johansen, 2017).

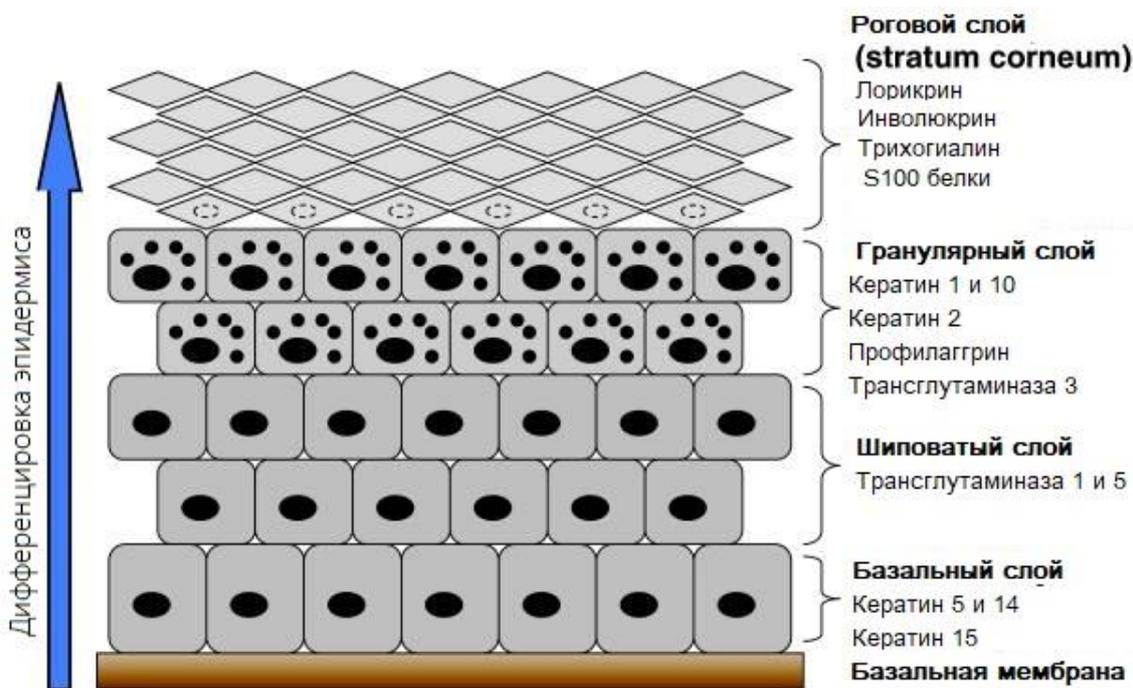


Рисунок 6. По мере дифференцировки кератиноциты продвигаются вверх через различные слои эпидермиса, все более уплотняясь в размерах, и в конечном итоге отшелушиваются с поверхности кожи в результате десквамации (потеря наружных слоев кожи). Каждая стадия дифференцировки эпидермиса характеризуется экспрессией специфических белков. Мелкие черные точки на рисунке представляют собой гранулы кератогиалина в клетках зернистого слоя (Sandilands et al, 2009).

В **базальном слое** в основном находятся пролиферирующие и неproлиферирующие кератиноциты. Помимо них здесь находятся меланоциты и одиночные стволовые клетки. В этом слое морфология кератиноцитов отличается крупным размером ядер, содержанием в цитоплазме крупных гранул с меланином. Под базальным слоем клеток находится базальная мембрана, к которой кератиноциты крепятся посредством гемидесмосом (Catunda et al., 2019).

После покидания базального слоя в кератиноцитах начинает синтезироваться маркерный структурный белок *инволюкрин (Inv)*, таким образом, он экспрессируется в шиповатом и гранулярном слоях. Позже инволюкрин включается в ороговевшую оболочку с помощью фермента трансглутаминазы, которая его сшивает в шиповатом слое (Watt , Phil D, 1983). Кодирующая последовательность инволюкрина в значительной степени состоит из богатых глутамином повторов, которые служат сшивающим субстратом (Brettmann, de Guzman Strong, 2018; Eckert et al., 2002).

Трансглутаминазы (TGM) – это ферменты, катализирующие Ca^{+2} -зависимые реакции образования связей между γ -карбоксамидной группой глутамина и α -аминогруппой лизина или других первичных Аминов. Полученные поперечные связи являются ковалентными, стабильными и устойчивыми к протеолизу, что повышает устойчивость белков к химическому, ферментативному и физическому разложению (Hiiragi et al., 1999). Трансглутаминаза 3 (TGM3) участвует в сшивке структурных белков в кератиноцитах с образованием ороговевшей оболочки эпидермиса, экспрессируется на поздних стадиях терминальной дифференцировки эпидермиса и в некоторых типах клеток волосяной оболочки. Таким образом, TGM3 играет важную роль в формировании кожи, в частности ороговевших слоев, имеющих барьерную функцию. Фермент имеет молекулярную массу 77 кДа как у человека, так и у мыши. Активация фермента происходит расщеплением протеазой с высвобождением компонентов массой 50 и 27 кДа, которые остаются связанными вместе (Martinet et al., 1988; Zhang et al., 2005).

Другая трансглутаминаза 1 (TGM1) также участвует в сшивании белков в кератиноцитах и формировании ороговевшей клеточной оболочки терминально дифференцированного эпидермиса (Zhang et al, 2005).

В совокупности TGM1 и 3 способствуют агрегации кератина в фибриллы и образованию клеточного конверта кератиноцитов в результате процесса кератинизации, но в TGM3 объединяет молекулы путем внутримолекулярных

сшивок, а TGM1 образует более крупные олигомеры во время ороговения. Таким образом, трансглутаминазы работают на переходе от гранулезного слоя в роговой (Liedén et al., 2012; Shimada et al., 2018).

Протеинкиназа С (ПКС) повышает активность трансглутаминазы, что также способствует дифференцировке кератиноцитов. ПКС работает через активацию MAPK каскада. Есть еще второй путь, запускаемый ПКС: киназа формирует комплекс с cyclinE/cdk2/p21 для уменьшения активности cdk2, что приводит к снижению пролиферации кератиноцитов, лежащих в более высоких слоях эпидермиса (Eckert et al., 2002).

В шиповатом слое эпидермиса усиливается экспрессия кератинов. Гранулы кератиноцитов данного слоя содержат различные липиды (церамиды, холестерин, свободные жирные кислоты и прочие), которые, высвобождаясь, придают коже гидрофобность (Хлебникова, 2015).

В гранулированном, или зернистом слое в гранулах так же находится большое количество липидов, а также различные специфические белки. Здесь синтезируются предшественник филаггрина, белок *профилаггрин* и другие структурные белки, входящие в состав клеточной оболочки кератиноцитов (Nithya et al, 2015).

В роговом слое эпидермиса кератиноциты дифференцируются в роговые чешуйки, ядра и органеллы исчезают, остаются кератиновые нити. Клетки этого слоя постоянно отшелушиваются, а на их место приходят новые кератиноциты из нижних слоев эпидермиса.

Это мертвые клетки, связанные между собой цементирующим веществом, а также каждая клетка в результате кератинизации, или дифференцировки, становится окруженной ороговевшей клеточной оболочкой, или клеточным конвертом. Эта оболочка представляет собой жесткую белково-липидную полимерную структуру, образующуюся под цитоплазматической мембраной (Ishida-Yamamoto et al., 2018). В нормальном эпидермисе клеточный конверт

представляет собой нерастворимую структуру толщиной 15 нм. Ороговевшая клеточная оболочка, или клеточный конверт включает в себя две функциональные части: одна содержит ковалентно сшитые белки (толщиной 10 нм), которые составляют основу оболочки; другая часть содержит ковалентно связанные керамидные липиды (толщиной 5 нм). Белковая оболочка включает в себя сшитые структурные маркерные белки, такие как инволюкрин, лорикрин, трихогиалин, S100 белки, цистатин А, малые пролин-богатые белки, путресцин, аннексин и другие (Catunda et al., 2019). В ранней фазе формирования клеточного конверта происходит посредством взаимодействия TGM1 и инволюкрина, которые экспрессируются наряду с кератинами K1 и K10 в нижних слоях кератиноцитов. Впоследствии, TGM1 связывает инволюкрин и межклеточные керамидные липиды в клеточной мембране. В результате, TGM1 связывает вместе сшитый инволюкрин и лорикрин – небольшие богатые пролином белковые комплексы, которые ранее были объединены TGM3 (Shimada et al, 2018).

Когда гранулированные клетки дифференцируются в ороговевшую клетку, профилаггрин в гранулах протеолизирован и расщепляется на множество мономеров *филаггрина (Flg)*, который потом агрегирует с кератином в фибриллы с помощью трансглутаминазы 1.

Вместе кератины и филаггрин составляют 80-90% белковой массы эпидермиса млекопитающих (Proksch et al., 2008). Антитела на филаггрин указывают, что этот белок находится диффузно в нижних слоях ороговевших клеток, а в более поверхностных слоях отсутствует. В ходе эпидермальной дифференцировки происходит отделение филаггрина от структуры ороговевшей оболочки, и он подвергается действию каспазы-14 и деградирует (Ishida-Yamamoto et al., 2018; Їepelak et al., 2019). Его предшественник профилаггрин локализуется в гранулах кератогиалина в зернистом слое (Ishida-Yamamoto et al., 2018). При возникновении мутаций филаггрина происходит дисфункция кожного барьера. Из-за нарушения барьера могут происходить

воспалительные процессы, к тому, отсутствие нормальной функции филаггрина приведет к кожному обводнению и к повышению рН кожи (Śerelak et al., 2019).

Поскольку функция мономеров филаггрина заключается в иницировании агрегации и распада кератиновых нитей, экспрессия профилаггрина должна строго контролироваться во время дифференцировки эпидермиса, чтобы предотвратить любое преждевременное взаимодействие между этими компонентами цитоскелета. Так, например, факторы семейства AP1 (Jun и Fos) регулируют экспрессию профилаггрина (Sandilands et al, 2009).

Также было показано, что транскрипционный фактор р63 имеет важное значение для развития эпидермиса. Существует несколько видов изоформ р63: трансактивирующие доменосодержащие изоформы TAp63 α and TAp63 γ , а также изоформа Δ Np63 α блокируют транскрипцию филаггрина, в то время как Δ Np63p40 позволяет экспрессировать полную панель маркеров эпидермальной дифференцировки, в том числе профилаггрин (Sandilands et al., 2009).

Лорикрин (Lor) – элемент клеточного конверта кератиноцитов, нерастворимый белок массой 26 кДа, усиливающий защитный барьер, является одним из основным белком ороговевшей оболочки. Лорикрин сильно трансгугтаминирован, то есть у него множество внутри и межклеточных поперечных связей, которые обладают высокой устойчивостью к протеолизу. Он начинает экспрессироваться в гранулярном эпителии и является поздним дифференцировочным белком (Catunda et al., 2019). Также лорикрин прочно связывается с помощью трансглутаминаз к липидам эпидермиса. Липидная пластинка, таким образом, становится средой, в которую окончательно внедряется мертвый кератиноцит (Nithya et al., 2015).

Липиды являются неотъемлемой частью ороговевшей оболочки. Ковалентное связывание между церамидными липидами и белками эпидермиса отвечает за упорядоченное расположение внеклеточных липидов в пластинках, что способствует барьерной защитной функции клеточного конверта.

Липидный и пластинчатый комплекс усиливается связыванием ферментов трансглутаминаз с белками, такими как лорикрин, небольшие пролиновые белки, трикохиалин и репетин. Связывание изменяет биомеханическую структуру оболочки в зависимости от ее локальной физической потребности. Липидная пластинка, таким образом, становится средой, в которую окончательно внедряется мертвый корнецит (чешуйка рогового слоя), состоящий из промежуточных нитей, обеспечивающих контролируемую механическую и водопроницаемость.

Кератины – финальный дифференциальный продукт клеток эпителия; являются структурными белками, относящиеся к мультигенному семейству, функция которых заключается в формировании кератиновых нитей. В основном кератины входят в состав роговых производных эпидермиса кожи (волосы, ногти, рога, перья и др.), не считая кератиноцитов самого эпидермиса.

Кератины устойчивы к обработке пепсином или трипсином, нерастворимы в воде, кислотах, щелочах и органических растворителях, но могут быть растворимы в растворах, содержащих денатурирующие агенты, такие как мочевины (Steinert et al., 1982). Молекулярная масса кератинов млекопитающих колеблется от 40 до 70 кДа. Кератины классифицируются по молекулярной структуре, физико-химическим характеристикам, по клеткам и тканям, в которых они продуцируются (Bragulla, Homberger, 2009).

По вторичной структуре кератинов эти белки разделяют на две группы: α -кератины имеют конформацию в виде α -спиралей, содержат большое количество цистеина, множество дисульфидных связей, и именно такие чаще представлены у людей; β -кератины – более твердые, в структуре имеют β -листы.

По номенклатуре кератиноцитов от 2006 года Швейцера кератины делят на две большие группы: кератины I и II типов (Schweizer et al., 2006). Зрелые филаменты содержат кератины типов I и II в молярном соотношении 1:1, это

является основным условием для скоординированной транскрипции генов данных типов. Интересно, что в своем большинстве гены кератинов типов I и II регулируются попарно, в соответствии с типом ткани и характером дифференцировки (Schweizer et al., 2006).

Клетки простого, не многослойного эпителия, всегда синтезируют на регулярной основе такие кератины как K8/K18, а в многослойном эпителии, то есть в том числе в эпидермисе, синтезируются кератины K5/K14. В дополнение к этим кератином в многослойном эпителии могут синтезироваться так же K15 и K6/K16. Далее при последующей дифференцировке кератиноцитов эпидермиса клетки начинают синтезировать другие типы кератинов (Bragulla, Homberger, 2009).

Кислые кератины, они же кератины типа I, включают в себя K9-K28, и представляют собой 17 эпителиальных кератинов человека. Номера 11, 21 и 22 не используются по исторически причинам: например, первоначально считалось, что K11 является уникальным генным продуктом, но позже оказалось, что это полиморфный вариант K10; K21 является ортологом крысы для человеческого и мышинового K20; номер K22 никогда не использовался. Помимо этих кератинов к типу I также относятся кератины волос человека K31-K40, и кератины эпителия и волос не человека – это K41-K70 (Schweizer et al., 2006).

Основные кератины, то есть K1-K8, K71-K80 и K81-K86 человека, относятся к кератином типа II. Некоторые из них специфичны для мягкого ороговения эпителия (K1-K8, K71-K80), другие для жесткого (K81-K86) (Schweizer et al., 2006).

В гранулярном слое эпидермиса синтезируется основная пара *кератинов K1/K10* (гены *Krt1, Krt10*), в базальном слое, в пролиферирующихся клетках – их сополимеризующаяся пара K5/K14. Прекращение деления клеток совпадает с появлением пары K1/K10. Кератин K1 может немного варьировать у млекопитающих: так, в эпидермисе человека K1 имеет молекулярную массу 65 кДа, а в эпидермисе крысы 66 кДа (Bragulla, Homberger, 2009). K1 вместе с K10

(56,5 кДа) продуцируются в супрабазальных клетках эпидермиса, поэтому они считаются важными для постмитотической кератинизации. Они являются доминантными цитоскелетными филаментами при переходе от пролиферативной стадии к терминальной стадии дифференцировки. После их экспрессии они интегрируются в кератиновую филаментную сеть вместе с K5 и K14 (Kartasova et al., 2009).

Кератин 2 (Krt2) по массе составляет 65,5 кДа у человека, 70 кДа у мышей, аминокислотная последовательность схожа с таковой у K1 и K5. K2 наиболее часто экспрессируется в шиповатом слое, а при механическом напряжении эпителия (например, ухо, хвост мыши) синтез K2 усиливается и индуцируется нижележащей дермой. K2 также может экспрессироваться в поверхностных клетках эпителия слизистых оболочек. Этот основной кератин может образовывать гетеродимеры с кислотными K9 и K10 (Bragulla, Homberger, 2009).

Кератин 5 (ген Krt5), молекулярная масса 56 кДа, вырабатывается вместе с *K14 (Krt14)* в качестве первичных кератинов базального слоя эпидермиса. Они продуцируются в митотически активных кератиноцитах, и этот процесс никак не связан со степенью дифференцировки клеток. В эпидермисе по мере того как клетки движутся вверх и дифференцируются, уровень экспрессии K5/K14 постепенно снижается и начинает индуцироваться K1/K10. K5/K14 являются хорошими маркерами деления базальных кератиноцитов и помогают поддержанию формы клеток эпидермиса. Мутации K5 и K14 приводят к наследственной болезни буллезный эпидермолиз простого типа (ПБЭ). Потеря этих кератинов не может быть полностью компенсирована эктопической экспрессией других кератинов, что говорит о том, что для нормального развития и функционирования эта пара кератинов обязательна и что они выполняют уникальные регуляторные функции. Также, интересно, что K14 участвует в регуляции определенных сигнальных путей связанных с апоптозом

через TRADD и внеклеточную сигнал-регулируемую протеинкиназу (ERK) (Alam et al, 2011; Bragulla, Homberger, 2009).

K5/K14 имеют важную роль в формировании эпидермиса на ранних стадиях развития. Вместе с плектином и β 4 интегрином они участвуют в образовании гемидесмосом. Взаимодействия между кератинами и гемидесмосомами являются важным моментом в клеточно-матриксной адгезии и в миграции клеток эпидермиса (Seltmann et al., 2013).

Кератин 15 (Krt15) экспрессируется в базальных слоях эпидермиса, особенно у плода, а также в ногтевой пластине человека. K15 синтезируется во множестве кератиноцитов внешней роговой оболочке человеческого волоса. Его синтез может повышаться в отсутствие K14. Его экспрессия, по-видимому, связана с более зрелыми клетками базального слоя, которые являются более стабильными и имеющими более низкую скорость деления. K15 присутствует больше в тонких участках эпидермиса кожи, чем, например, в клетках толстой кожи подошвы ног. К тому же, K15 является характерным кератином в стволовых клетках эпидермиса (Waseem et al, 1999). K15 взаимодействует в основном с K5 для создания гетеродимеров, в результате чего они образуют более тонкие нити филаментов, чем гетеродимеры K5 и K14 (Bragulla, Homberger, 2009).

Кератин 16 (Krt16), молекулярная масса 46 кДа; его экспрессия определяется подмножеством эпителиальных клеток в процессе морфогенеза кожи и сопутствующих клеток наружной оболочки корня волоса. Экспрессия K16 не совпадает с экспрессией его партнера K6, с которым он обычно связан. K6 синтезируется во время эмбрионального развития кожи, а K16 маркирует клетки, которые находятся в промежуточном состоянии клеточной дифференцировки между базальными и супрабазальными клетками. K16 обеспечивает структурную стабильность, гибкость, нужные для движения клеток и митоза. В целом, K16/K6 являются маркерами активированного состояния кератиноцитов, их гиперпролиферации, поэтому часто повышенная

экспрессия K16 наблюдается во время регенеративных процессов кожи и часто K16 рассматривается именно как маркер регенерации (Bragulla, Homberger, 2009).

Составные части цитоскелета в эпителиальных клетках – это три типа филаментов, каждый из которых обладает специфическими свойствами и которые взаимодействуют друг с другом при формировании цитоскелета эпителия. Это микрофиламенты, микротрубочки и промежуточные филаменты. Микрофиламенты – актиновые нити цитоскелета диаметром 7 нм. Такие актиновые нити прикрепляются с помощью актинсвязывающих белков, например, *плектина (Plect)*, к клеточной мембране посредством фокальных адгезий, являющихся частью плотных контактов. Микротрубочки – самые крупные элементы цитоскелета, диаметр которых составляет 20 нм. Они собраны из молекул α -и β -тубулина, которые образуют гетеродимеры. Организующие микротрубочки центры также связаны с кератиновыми нитями, что поддерживает полярность клеток. Промежуточные филаменты могут собираться в пучки различного диаметра от 7 до 12 нм, они не являются поляризованными в отличие от предыдущих двух составляющих цитоскелета. Они служат в основном каркасом для цитоскелета. Именно в состав промежуточных филаментов входят кератины, которые экспрессируются исключительно в клетках эпителия, не зависимо от происхождения зародышевого слоя этих клеток (Bragulla, Homberger, 2009).

МАРК киназы являются основными регуляторами дифференцировки кератиноцитов. Недавние исследования показывают, что разные про-дифференцировочные сигнальные пути киназ приводят к МАРК каскаду. ASK1 – киназа апоптоза, является киназой киназ МАРК, вовлеченная в стресс-индуцированный сигнал. ASK1 экспрессируется в супрабазальных слоях эпидермиса, поэтому вероятно, что он регулирует кератинизацию (Sayama et al.,

2001). Также экспрессия ASK1 активирует JNK и P38 MAPK-ассоциированные белки. Экспрессия маркерных генов, таких как трансглутаминазы, лорикрина, инволюкрина, также повышается при чрезмерной экспрессии ASK1 (Sayama et al., 2001). Активность Ras тоже необходима для экспрессии маркерных белков, так как сигнал Ras передается вниз по течению к MEKК1 (Ефимова и др., 1998).

При патологических состояниях (например, псориаз) или во время регенеративных и адаптивных процессов (например, заживление ран) эпидермис человека переключается с нормальной программы дифференцировки на "гиперпролиферативную" программу. При этом изменяется экспрессия различных цитокератинов, возникает преждевременная экспрессия маркеров дифференцировки (инволюкрин, трансглутаминаза) в клеточных слоях и увеличение количества циклических клеток (Alkemade et al., 1994).

При образовании некоторых карцином наблюдается повышенная экспрессия K5, K6 и K14. В исследованиях *in situ* и инвазивных карцином мочевого пузыря было показано увеличение экспрессии *Krt5/6* и *Krt14* и отмечена частая потеря *Gata3*. Потеря *Gata3* способствует эпителиально-мезенхимному фенотипу, инвазии, и в целом к ЭМП. Экспрессия K14 предшествует экспрессии K5/6 в базальном слое эпителия. K14 является одним из маркеров для нормальных стволовых клеток карцином и раковых стволовых клеток, но Дадхания с коллегами показали, что для иммуногистохимического анализа с целью определения карциномы следует рассматривать комбинацию K5/6 и *Gata3* (Dadhania et al., 2016; Jangir et al., 2019).

2.2.4 Иммуортиализованные культуры кератиноцитов. HaCaT

В качестве моделей кератиноцитов человека часто используют клеточную линию HaCaT, которая была получена в 1988 году из спонтанно трансформированных эпителиальных клеток кожи взрослого человека (Boukamp

et al., 1988). Эта культура сохраняет дифференцировочный потенциал в культуре, экспрессирует классические маркеры кератиноцитов, хотя и не все. Так, например, клетки HaCaT способны экспрессировать *Krt1*, *Krt10*, *Inv*, *Flg* (Зайцева, 2014; Boukamp et al., 1988).

HaCaT является удобной моделью для изучения кератинизации, пролиферации, апоптотической гибели клеток, а также эту культуру удобно использовать для создания моделей различных болезней. HaCaT способны полноценно дифференцироваться и образовывать многорядные упорядоченные пласты (Зайцева, 2014). Как у экспериментальной модели, у HaCaT есть ряд преимуществ и перед нормальными эпидермальными кератиноцитами человека. HaCaT легче культивировать *in vitro*: данные клетки не требуют добавления в среду дополнительных ростовых факторов, кроме этого, не требуется поддержания в среде низкой концентрации ионов кальция (Соболева и др., 2014).

Несмотря на меняющийся и неограниченный потенциал роста HaCaT, так же, как и нормальные кератиноциты, организуют структурированные и дифференцированные эпидермальные слои ткани, если их трансплантировать к мыши, а также они экспрессируют специфические для кератиноцитов белки, включая кератины, инволюкрин, филаггрин. HaCaT – это первая постоянная линия эпителиальных клеток, полученная из кожи взрослого человека, и которая проходит нормальную дифференцировку, что позволяет использовать их, как модели для изучения кератиноцитов (Boukamp et al., 1988).

Экспрессия и локализация маркеров в культуре HaCaT выражена вполне нормально, что было выяснено с помощью иммунофлуоресцентного метода (Schoor et al., 1999): в эксперименте Шупа начиная с 7-го дня культура HaCaT *in vitro* экспрессировала ранние маркеры K1 и K10, которые были сильно выражены и четко ограничивали супрабазальные слои; то же наблюдалось с K16, который, как известно, повышается в раневых и регенерирующих тканях. Локализация инволюкрина и трансглутаминазы 1 менялась в культуре со

временем. После первой недели эти маркеры распределялись с самых верхних слоев, а позже оказывались в нижних супрабазальных слоях. В случае с трансглутаминой даже некоторые базальные клетки оказывались положительными. Филаггрин и К2 обнаруживались по началу в одиночных клетках верхних слоев, затем в шиповатом и роговом слоях. Лорикрин начинал экспрессироваться намного позже, после 2-3 недели также в шиповатом и роговом слоях. Окрашивание коллагена 7 точно наблюдалось только в старых культурах.

Хотя HaCaT демонстрирует хорошую организацию, но эта культура потеряла часть дифференцировочных характеристик нормальных кератиноцитов из-за генетических изменений (Schoop et al., 1999).

2.2.5 Фибробласты

Фибробласты – это мезенхимальные клетки, которые откладывают коллаген и эластические фибриллы экстрацеллюлярного матрикса в соединительных тканях. Их форма довольно разнообразна и зависит от уровня их активности и расположения в организме (Driskell, Watt, 2015).

Фибробласты были найдены в большинстве тканей, в том числе и в коже, где различные субпопуляции фибробластов обладают разными функциями. Это функциональная гетерогенность влияет на варьированность длительности жизни фибробластов, и это разнообразие растет с эмбрионального периода. Фибробласты в разных локациях организма имеют различное эмбриональное происхождение. К примеру, фибробласты кожи лица происходят от нейрального гребня, в коже вентральной части тела фибробласты происходят от латеральной мезодермы, в коже спины – из дермомиотома (Driskell, Watt, 2015).

В коже человека фибробласты расположены преимущественно в дерме. Дерма - соединительная ткань, подстилающая эпидермис и отделенная от него базальной мембраной. В неонатальном периоде в коже выделяются два слоя дермы: верхний (*папиллярный*) слой дермы, который отделен от нижележащего

(ретикулярного) разницей плотности фибробластов и зрелостью коллагенового матрикса (Рис.7). Папиллярный слой в верхней части организован в тяжи, которые называются кожными сосочками, содержащие нервные окончания и микрососуды, необходимые для питания и иннервации. Папиллярный слой отличается от ретикулярного более высокой плотностью фибробластов, повышенным содержанием протеогликанов и слабо выраженным содержанием коллагеновых волокон. Плотность этого слоя уменьшается в направлении от базальной мембраны к ретикулярному слою дермы. Это веретенообразные клетки с высокой пролиферативной и синтетической активностью. Причем, чем старше донор фибробластов, тем больше эти клетки распределены по субстрату: с возрастом папиллярная популяция фибробластов теряет свой высокий потенциал роста (Ripra et al., 2019).

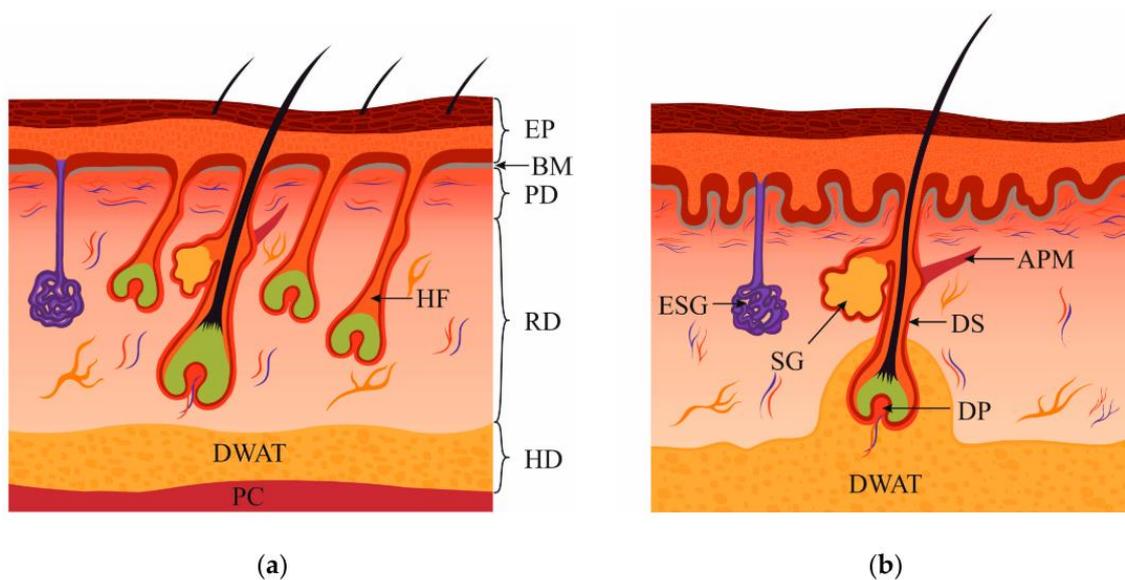


Рисунок 7. Структура кожи: а) структура кожи мыши. Кожа мышей имеет высокую плотность волосяных фолликулов (HF). Папиллярный слой находится под подкожной клетчаткой. б) структура кожи человека. Структура кожи человека отличается от структуры кожи мышей. Эпидермис утолщен и образует вросшие образования. Соответственно, папиллярная дерма образует дермальные сосочки. Плотность HF в коже меньше по сравнению с мышью. Белая жировая ткань дермы (DWAT) имеет конусообразную форму. APM — арректор пили мышц; BM—базальная мембрана; DP — дермальные сосочки; DS — кожная оболочка; ЭР—эпидермис; ESG — эккринные потовые железы; HD — гиподерма; PC — panniculus carnosus; PD — сосочковый слой дермы; RD — ретикулярной дермы; SG — сальные железы. (Ripra et al., 2019)

Ретикулярная дерма отделена от папиллярного слоя сосудистым сплетением. Клетки сильно растекаются по субстрату и имеют звездчатую форму; имеют низкую пролиферативную и синтетическую активность. Внеклеточный матрикс ретикулярного слоя имеет более выраженную структуру: коллагеновые пучки организованы в более плотные волокна, которые вместе с эластиновыми нитями образуют упорядоченную сеть. С возрастом папиллярная дерма уменьшается, становится тоньше и постепенно замещается ретикулярной (Vorotelyak et al, 2019).

Скопление фибробластов у основания волосяного фолликула (дермальный сосочек), необходим для морфогенеза волосяных фолликулов и координации волосяного цикла. Сигналы от эпидермальных стволовых клеток в волосяных фолликулах индуцируют соседние фибробласты формировать гладкую мускулатуру, которая поднимает волос (пилоэрекция) (Driskell, Watt, 2015).

В дополнение к аутокринным сигналам, фибробласты также чутко отвечают на сигналы Wnt пути, которые получают от вышележащих слоёв эпидермиса, который может подавать сигналы локальные посредством экстрацеллюлярного матрикса или влиять на поведение фибробластов на расстоянии, выделяя различные факторы (Driskell, Watt, 2015).

Интересно, что если фибробласты выделить из кожи взрослого человека и поместить в культуру или пересадить на новое место, то они проявят позиционную память, что отражается в экспрессии Homeobox-генов (Hox) (Driskell, Watt, 2015).

Неоднородность фибробластов в коже определяется различными наборами маркеров, что определяет их характерные особенности синтезировать и реконструировать внеклеточный матрикс. Ремоделирование поддерживается металлопротеиназами и их ингибиторами (Rippa et al., 2019). Хорошо изучены такие маркеры, как виментин, 1 α 2 цепь коллагена, клеточные рецепторы PDGF α и PDGF β (platelet-derived growth factor subunit α/β). Правда эти маркеры

способны синтезироваться и другими клетками организма, к примеру, эндотелиальными и миоэпителиальными клетками способен вырабатываться виментин, остеобластами, а хондробластами вырабатывается 1 α 2 цепь коллагена, что усложняет задачу идентификации и отслеживания субпопуляция фибробластов в процессе развития. Хотя способность синтезировать коллаген I является основной и объединяющей типичной особенностью фибробластов (Driskell, Watt, 2015).

Коллаген I является доминирующим компонентом межклеточного матрикса дермы, составляя примерно 70 % от его сухого веса. В дерме также присутствует коллаген III, которого примерно в 4 раза меньше, хотя в неонатальный период соотношение первого и четвертого коллагенов составляет примерно 1:1, так же, как и в недавно зажившей человеческой коже (Ripra et al., 2019).

При дифференцировке фибробласты начинают экспрессировать различные маркеры, отличающие общих фибробластов-предшественников от папиллярных дермальных фибробластов верхней дермы и ретикулярных дермальных фибробластов нижней дермы. Dlk1 и Scf1 вместе динамично экспрессировались в сетчатке и подкожной клетчатке в течение раннего морфогенеза кожи. Несколько маркеров также дифференцированно экспрессируются в верхней (папиллярной) и нижней (ретикулярной) дерме кожи человека. В дополнение к нижней и верхней дерме, общие фибробласты предшественника могут также дифференцироваться в дермальные сосочки или давать начало папиллярным дермальным фибробластам и мышечным клеткам arrector pili. Клетки дермальных фибробластов экспрессируют ряд различных маркеров: щелочная фосфатаза и клеточный ретиноевый кислотосвязывающий белок 1 (CRABP1) экспрессируются в клетках дермальных фибробластов на протяжении всего цикла роста волос, хотя экспрессия щелочной фосфатазы не ограничивается фибробластами с индуктивными свойствами волос. Экспрессия

Sox2 особенно выражена в дермальных фибробластах волосяного покрова (Driskell, Watt, 2015).

Для всех фибробластов характерно наличие небольших богатых лейцином протеогликанов, декорина и люмикана, регулирующих сборку коллагеновых фибрилл. Эти белки экспрессируются во всей толще дермы на высоком уровне. CD90 – еще один маркер фибробластов, который синтезируется в толще всей дермы, хотя регистрируется не во всех клетках, и считается, что характерен больше для ретикулярного слоя (Philippeos et al., 2018).

S100A4 является маркерным белком фибробластов в различных органах, также известный как FSP1. S100A4 принадлежит к семейству S100 Ca²⁺-связывающих протеинов и также является белком, ассоциированным с метастазами. S100A4 опосредует метастазирование, способствуя подвижности клеток, деградации внеклеточного матрикса и ангиогенезу. Но недавно S100A4 утвердился в том, что является важным белком для всех фибробластов, нужный для ремоделирования нормальных тканей. Известно, что S100A4 способствует экспрессии *p53* (Tasaki et al., 2013).

Папиллярным фибробластам человека характерен синтез маркеров CD39, PDPN и NTN1. Компоненты межклеточного матрикса способствуют росту кератиноцитов. Кроме того, продолжительность жизни эпидермиса увеличивается при культивировании именно на папиллярных фибробластных матриксных эквивалентах кожи. Клетки, полученные от более молодых доноров, способны поддерживать формирование более стратифицированного и дифференцированного эпидермиса, чем от ретикулярных клеток донора этого же возраста; с возрастом все показатели снижаются (Philippeos et al., 2018; Ripra et al., 2019)

Для ретикулярного слоя характерны белки CD36, TGM2, MGP, PPAR γ , ACTA2 и CD90. TGM2 активация ассоциирована с работой TGF- β 1. Этот фактор роста может синтезироваться и самим ретикулярным слоем. CD36

экспрессируется в основном в нижних слоях ретикулярной дермы и в гиподерме. Кератиноциты, выращенные на фибробластах ретикулярного слоя, имеют нерегулярную форму и синтезируют маркеры в основном только базального слоя (Barrett et al., 2018; Philippeos et al., 2018).

MGP (matrix Gla protein) – наиболее яркий маркер ретикулярных фибробластов, особенно *in vivo*. Вероятно, он участвует в поддержании плотности ткани, так как ретикулярная дерма плотнее папиллярной. Он является мощным ингибитором кальцификации тканей, витамин К служит для него важным кофактором (Barrett et al, 2018).

Важно высвобождение фибробластами таких критических сигнальных факторов в регуляции кератиноцитов, как KGF и GM-CSF. В культуре папиллярные фибробласты синтезируют меньше KGF, чем ретикулярные, но показывают повышенную экспрессию GM-CSF (Rippa et al, 2019).

Было замечено, что экспрессия маркера CD39 в фибробластах снижается после первого пассажа, в то время как CD90 и CD36 остаются стабильными. Это показывает, что в культуре может возникать потеря некоторых маркеров, и это не связано с конкуренцией между различными субпопуляциями фибробластов (Philippeos et al., 2018).

2.3 Генодерматозы

Существует множество наследственных заболеваний, связанных с кожными осложнениями, проблемами в структуре или функциях слизистых, эпидермы, дермы. Эти болезни обобщенно можно назвать генодерматозами и они могут быть вызваны хромосомными, полигенными мутациями или мутацией отдельных генов. Наиболее частыми группами генодерматозов являются ихтиоз, буллезный эпидермолиз, эктодермальная дисплазия, кератозы, пигментная ксеродерма, но это далеко не весь список кожных наследственных заболеваний. Генетическая гетерогенность очень

распространена, поэтому требуются большие усилия в постановке диагноза, используя молекулярную диагностику (Vabu et al., 2015).

Для диагностики генодерматозов часто используется окрашивание специфических белков кератиноцитов и фибробластов криосрезов биоптата кожи и с помощью иммуногистохимических методов определяется экспрессия специфических белков. Это дает некоторую основу для дальнейшего поиска конкретной мутации. Иммуногистохимия используется наряду с методами ДНК-диагностики.

Генодерматозы могут проявляться в результате мутаций в различных структурных и функциональных генах. Часто генодерматозы возникают из-за нарушения именно структурных белков, в результате чего возникают дефекты кожных барьеров. Так, мутации в гене лорикрина *Lor* приводят к аномалиям развития ороговевшей клеточной оболочки или к дефектным апоптозам дифференцирующихся кератиноцитов. В результате этого могут возникнуть такие нарушения, как кератодермия или псориаз (Catunda et al, 2019). Нарушения приводят к повышению хрупкости клеток, которые разрываются при физических напряжениях, что является причиной возникновения различных волдырей (Nithya et al, 2015). Такие нарушения кожных барьеров также, например, являются ключевыми особенностями хронического воспалительного кожного заболевания атопической экземы, которая возникает из-за возникновения мутаций в гене белка филаггрина *Flg*, который играет ключевую роль в барьерной функции кожи (Catunda et al, 2019).

Очень тяжелые заболевания возникают при нарушении работы ферментов терминальной дифференцировки, к примеру, мутации в генах, кодирующих транглутаминазы, если это не приводит к летальному исходу. В семьях с такими мутациями были зарегистрирован ламеллярный ихтиоз, аутосомно-рецессивное кожное заболевание, которое сопровождается эритродермией (Hiiragi et al., 1999). Также, возможно возникновение такого заболевания как плоский лишай полости рта, который характеризуется гиперкератозом,

утолщением орто- и пара-кератинизированных слоев. При плоском лишае K13 исчезает, в то время как K10, локализованный в ороговевшем плоском эпителии, аномально выражен (Shimada et al., 2018).

Ихтиоз – наиболее часто встречаемое заболевание кожи наряду с буллезным эпидермолизом, характеризуется диффузным нарушением ороговения по типу гиперкератоза и проявляется образованием на коже чешуек. Является наследственным заболеванием, и может быть аутосомно-доминантным, X-сцепленным рецессивным, аутосомно-рецессивным. В чешуйках кожи при обычном ихтиозе происходит накопление лизина, лейцина, изолейцина, орнитина, аспарагиновой кислоты, а при X-сцепленном ихтиозе – уменьшение содержания серина (Гуляй, 2003; Корнеева, 2014).

В данной работе используются клетки кожи, полученные от пациентов с наследственным заболеванием *врожденный буллезный эпидермолиз* (ВБЭ). ВБЭ это группа генетически и клинически гетерогенных заболеваний, характеризующихся образованием на коже и слизистых пузырей и эрозий в результате малейших травм (Файн, Хинтнер, 2014). Болезнь может проявляться в виде различных форм тяжести и сопровождаться разнообразными внекожными осложнениями, связанных не только с кожей, но и с заболеваниями дыхательной, пищеварительной и мочеполовой системы, мышечной дистрофией, опухолями (March, Reichelt, 2018).

Различают несколько основных видов болезни: простой (ПБЭ), пограничный (ПоБЭ), дистрофический ЭБ (ДБЭ). Причиной возникновения данного заболевания в случае простого типа болезни ПБЭ являются неисправно работающие белки цитоскелета, такие как кератин 5 и 14, или плектина, в результате чего происходит расслоение эпидермиса из-за цитолиза кератиноцитов. В случае пограничного ПоБЭ возникают мутации белков адгезии (*LAMA3*, *LAMB3*, *LAMC2*, кодирующих цепи ламинина-332, ген *Col7A1*, кодирующий коллаген VII типа, гены *ITGA6* и *ITGB4*, кодирующих обе субъединицы $\alpha_1\beta_2$ -интегрина.), в результате чего пузыри образуются на границе

эпидермиса и дермы из-за расщепления светлой пластинки базальной мембраны, а также повреждение белков внеклеточного матрикса с белками ламины (ПоБЭ). В случае ДБЭ поврежден коллаген VII типа и пузыри образуются под плотной пластинкой базальной мембраны (*lamina densa*), то есть происходит отслоение дермы. Коллаген 7 образуется кератиноцитами и фибробластами, локализуется под базальной мембраной, где он входит в состав фибрилл, необходимых для прочного крепления эпидермиса к дерме. В коже больных количество таких фибрилл снижено или они морфологически неполноценны (Fine et al, 2008; March, Reichelt, 2018).

Пациенты с буллезным эпидермолизом имеют повышенный риск развития плоскоклеточных карцином кожи. Часто эти опухоли высокоагрессивны и представляют собой первую причину смерти в подтипе ДБЭ. В коже больных возникают множественные фиброзы, что является толчком для возникновения карцином. Также, известно, что дефицит коллагена 7 нарушает лизосомальную активность кератиноцитов и приводит к накоплению S100A8 и S100A9 – маркеров острого хронического воспаления, встречающихся у пациентов с ДБЭ (Condoirelli et al, 2019).

Таким образом, понимание механизмов иммортализации и механизмов дифференцировки клеток эпидермиса могут позволить получить иммортализованные культуры клеток кератиноцитов и фибробластов больных ДБЭ, что позволит их использование для дальнейшего анализа и изучения болезни, поиска оптимальных методов диагностики, генетических и фармакологических способов лечения и для использования иммортализации в регенеративной медицине.

3 Материалы и методы

Выделение РНК:

I. Первый стандартный метод: Все выделение происходит в чистых условиях с целью предотвращения попадания в образцы РНКаз.

- 1) Нужно снять питательную среду с клеток, промыть их версеном.
- 2) Переместить клетки в отдельную пробирку на 1,5 мкл и добавить тризол 1 мл; полностью гомогенизировать раствор. Оставить инкубироваться раствор с клетками 5 минут при комнатной температуре.
- 3) Добавить 200 мкл хлороформа; центрифугировать 10 минут на максимальных оборотах при температуре 4°. Отобрать супернатант (аккуратно, не затрагивая интерфазу) и переместить в новую пробирку.
- 4) К супернатанту добавить равный объем изопропилового спирта; центрифугировать на максимальных оборотах 10 минут. Удалить всю жидкость над осадком.
- 5) Добавить 200 мкл 80% этанола. Центрифугировать 5 минут.
- 6) Удалить спирт. Затем оставить для полного испарения остатков этанола. Добавить воду или элюирующий буфер 30-50 мкл.
- 7) Далее следует очистить образцы от ДНК: добавить буфер для ДНКазы и 1 мкл самой ДНКазы (DNase I и 10X Reaction Buffer with MgCl₂ фирмы ThermoFisher scientific); поставить на 20-30 минут на 37°C.
- 8) Дезактивировать ДНКазу прогреванием на 80°C, но перед этим обязательно добавить 1 мкл 20 mM ЭДТА в раствор.

II. Второй метод – выделение образцов РНК на колонках с использованием AllPrep DNA/RNA Mini Kit. В конце отчистки также советуется добавить на колонку 1 мкл ДНКазы, 1 мкл буфера для ДНКазы и 18 мкл воды; держать 20-30 минут при 37°C, затем элюировать буфером по протоколу, добавить 1 мкл 20mM ЭДТА.

Получение кДНК:

На матрице РНК с помощью набора реактивов MMLV (Евроген), содержащих обратную транскриптазу MMLV, по протоколу разработчиков синтезировалась кДНК, с использованием в качестве затравки random праймер – случайный гексануклеотид.

Электрофорез:

Для разделения фрагментов ДНК по длине был использован метод электрофореза в агарозном геле:

1) В плашку для электрофореза заливается горячая смесь толщиной до 5 мм 1-1,5% геля в трис-ацетатном буфере (агароза (Biotechnology Grade), helicon) с добавлением бромистого этидия или SYBR Green; на подложке закрепляется гребенка для создания лунок.

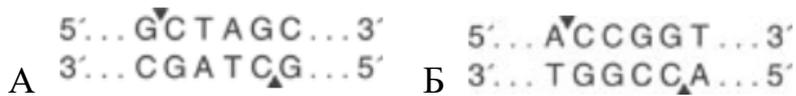
2) После застывания гребенка убирается, гель помещается в электрофорезную горизонтальную камеру. Смешиваем образцы с краской (6X Orange Loading Dye Solution или другой) и наносим образцы в лунки. Также в лунки наносится маркер длин ДНК – стандарт для определения длины двухцепочечных молекул ДНК (Маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder; маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder). Камера подключается к источнику питания, 120 В на 15-30 минут (PowerPac Basic, Bio-Rad).

3) Просматриваем гель в проходящем УФ-свете на трансиллюминаторе (ChemiDoc Imaging System), получаем изображение, меняя условия выдержки в зависимости от количества ДНК в геле.

Рестрикция:

- 1) Для проведения рестрикции готовится смесь, содержащая:
- ДНК образец (100 нг/мкл);
 - 10X NEB-Fast Digest буфер CutSmart (BioLabs);
 - По 1 мкл (20 unit/mkl) эндонуклеаз рестрикции. В данном эксперименте использовались рестриктазы NheI и AgeI-H (Termofisher; BioLabs);

- mQ H₂O.
- 2) Поставить в термостат на 1 час при 37°.
- 3) Далее рестриктазы следует дезактивировать при 70° в течение 20 минут или смесь очистить на колонках для очистки ДНК (Clean Up, Evrogen).
- 4) Для смеси проводится электрофорез с SYBR Green для выделения порезанной плазмиды.
- 5) ДНК, мигрирующая одной полосой нужной длины, вырезается из агарозного геля и очищается от агарозы по протоколу ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline).



А) Сайт рестрикции Nhe1, Б) сайт рестрикции Age1.

Лигирование:

Для проведения реакции лигирования готовится следующая смесь реактивов:

- Векторная плаزمиды;
- Олигонуклеотидная вставка. Соотношение вектор/вставка подбирают индивидуально. В случае лигирования небольших двухцепочечных олигонуклеотидов, имеющих большой молярный избыток концов относительно плазмиды, брали соотношение 1 мкл олигонуклеотидов к 6 мкл плазмиды.
- 1 мкл 1X буфер для T4 ДНК-лигазы (Biolabs);
- 1 мкл T4 ДНК-лигаза (Biolabs);
- Вода (до 10 мкл).

Оставить на 12 часов на +14°. Инактивация лигазы: 65°С в течение 20 мин.

Лигат далее можно трансформировать в компетентные клетки бактерий.

Трансформация:

- 1) Компетентные клетки бактерий *E.coli* взять со стока -70° , переместить в лед (в пробирке).
- 2) Добавить к аликвоте бактерий объем ≤ 10 мкл ДНК для трансформации (плазида, лигат); оставить на 30 мин во льду. В течение этого времени клетки с минимальным стрессом успевают оттаять.
- 3) HeatShock: клетки перенести на 1,5 мин на 42° .
- 4) Перенести снова в лед.
- 5) В пробирку к клеткам добавить 400 мкл LB; поставить на 37° на 40 мин.
- 6) Приготовить чашки Петри с агаром (на 100 мл LB 2 г бактериального агара + 200 мкл $\times 1000$ ампицилина).
- 7) Рассеять бактерии шпателем Дрыгальского на чашку с селективной средой и поставить в термостат на 37° на ночь.

Очищение ДНК от реакционных смесей, геля:

- I. Фенольный метод. Для объема смеси 100 мкл (можно достичь нужного объема добавлением элюирующего буфера):
 - 1) Внести 30 мкл фенола и 10 мкл хлороформа.
 - 2) Центрифугирование 5 минут на максимальных оборотах.
 - 3) Отобрать верхнюю фазу в отдельные пробирки
 - 4) К супернатанту добавить 1/10 от объема ацетата Na и три объема этанола 95%.
 - 5) Центрифугирование 10 минут, на максимальных оборотах.
 - 6) Супернатант удалить.
 - 7) Осадок высушить и растворить в нужном объеме элюирующего буфера (10-30 мкл).
- II. Использование готовых наборов для очищения ДНК:
 - ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline);
 - Cleanup Mini (Евроген).

3.1 Получение гена *Bmi-1* для клонирования и получения иммортализованных культур клеток.

1) Использовалась плаزمиды содержащая кДНК гена *Mus musculus Bmi-1*. Для получения нужной последовательности с кДНК проводили несколько последовательных ПЦР амплификаций, меняя концевые праймеры для внесения нужных последовательностей в кодирующую часть. Первая ПЦР с праймерами, специфическими кДНК *Bmi-1*: forward1 5'-ATGCATCGAACAACCAGAATCAAG-3' reverse1 3'-ACCAGATGAAGTTGCGAATTC-5' с использованием полимеразы LongAmpTaq, температура отжига 60° праймеров в режиме ПЦР, 29 циклов.

2) Продукт амплификации очищали после электрофореза в агарозном геле с SYBR green. Затем ДНК выделяли из геля с помощью ISOLATE II PCR and Gel Kit (Bioline). Эту пробу использовали для последующей ПЦР амплификации.

3) Для второй ПЦР обратный праймер следует заменить для дальнейшего встраивания последовательности на новый. Forward1-праймер сохраняется reverse1-праймер заменяется на reverse2 3'-СТААССАГАТГААГТТГС-5', используется полимеразы LongAmpTaq, 54°С температура отжига праймеров на первом цикле ПЦР, затем температуру повышали до 60° и проводили 22 цикла.

4) Аналогично проведен электрофорез и вырезан фрагмент ДНК рассчитанного размера (около 1 kb).

5) Далее для дальнейшего встраивания фрагмента ДНК в вектор нужно было ввести специфические сайты рестрикции: *Nhe* и *Age* на концы последовательности. Для этого были поставлены ПЦР с полимеразой OneTaq для фрагмента *Bmi-1* с праймерами forward1 и reverse3 primer_bmi1Age1 3'-АТСАССГГТААСАГТССТААССАГАТГААГТТ-5. 17 циклов, 61°.

6) Следующий ПЦР с полимеразой OneTaq LOXP27_*Nhe1*_bmi1_1dir 3'САТСГСТАГСАТААСТТСТГТАТАГГАТАСТТТАТАСГААГТТАТСАГГАААТГСАТСГААСААССАГА-5' для введения *Nhe*-сайта и LOXP27-сайта; 26 циклов, 60°.

7) Полученный фрагмент ДНК после гель-электрофореза был очищен на колонках набором Cleanup Mini (Евроген) из реакционных смесей. Полученная концентрация 240 нг/мкл.

8) Обработка фрагмента BmiI рестриктазами (NheI и AgeI-H).

9) ДНК очищена от рестриктаз фенольным методом. Итоговая концентрация 125 нг/мкл.

3.2 Получение конструкции CMV pL4 puro для клонирования Bmi-1 и получения иммортализованных культур клеток.

Плазмида CMV pL4 puro имеет несколько уникальных сайтов рестрикции в полилинкере, в том числе Nhe и Age, а также ген устойчивости к пурамицину и ампициллину. Используются уникальные сайты (поскольку если плазмида режется рестриктазой в более чем одном сайте, ничего заклонировать не удастся). В плазмиде присутствует энхансер CMV, нужный для дальнейшего стимулирования транскрипции целевого гена (Рис.8).

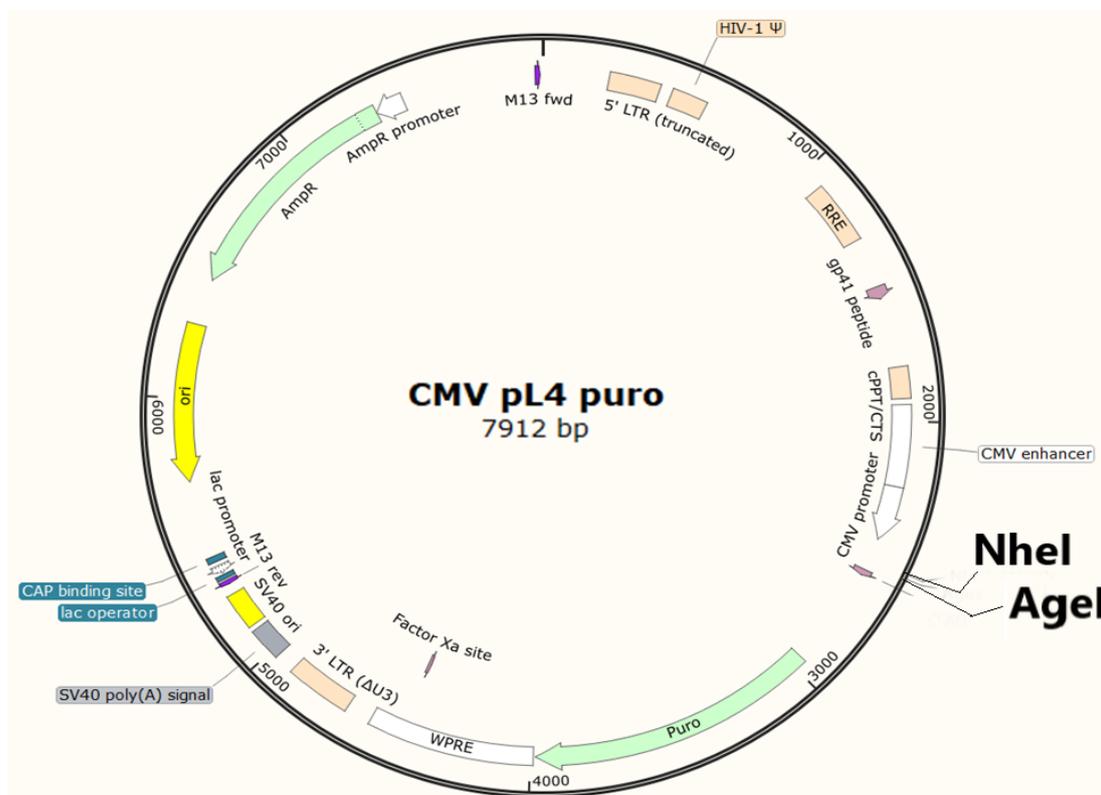


Рисунок 8. Карта плазмиды CMV pL4 puro (построена с помощью программы SnapGene Viewer 5.1.0).

1) Плазмида была трансформирована в компетентные клетки и поставлена наращиваться в 50 мл LB с антибиотиком в фальконе на 50 мл (1мкл x1000 ампицилина на 1 мл LB) при 37° на ночь для наработки препаративных количеств;

2) Бактериальная ночная культура была отцентрифугирована в фальконе, супернатант удален. К осадку (клеткам) добавлен соответствующий объем ресуспендирующего раствора, при этом хорошо попипетированно и перелито на колонки для очищения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген).

3) Далее по стандартному протоколу выделения плазмид были получены плазмиды CMV P14 puro.

4) Плазмиды были подвергнуты рестрикции эндонуклеазами NheI и AgeI-H; промежуточная концентрация примерно 30 нг/мкл.

5) Добавлена фосфатаза SAP 1 мкл на 18 мкл плазмиды, 2 мкл 10x буфера для SAP; поставлено на 1 час при 37°, затем в холодильник на -20°.

6) Инактивирование SAP 15 минут при 65°.

7) Очищение плазмиды фенольным методом.

Конечная концентрация CMV P14 puro NheAge – 20 нг/мкл.

3.3 Получение вектора CMV P14 puro – Bmi-1

Лигирование фрагмента кДНК Bmi-1 и плазмиды CMV P14 puro.

Трансформация лигата в компетентные клетки бактерий: были использованы компетентные клетки бактерий XLGold E.coli. На следующий день после трансформации выросшие колонии были проверены на наличие специфической вставки с помощью метода ПЦР с использованием праймеров на Bmi-1 (скрининг). 4 колонии дали положительный результат. Данные колонии были выращены в фальконах с LB и ампицилином, плазмиды очищены и секвенированы в компании Евроген.

3.4 Клеточные линии

Первичные фибробласты и эпидермальные кератиноциты от здоровых доноров и от больных врожденным буллезным эпидермолизом были получены путем пункционной биопсии.

Линии первичных клеток были immortalized с помощью трансдукции лентивирусами содержащими кДНК *hTERT* и, в случае кератиноцитов, кДНК гена *Vmi-1* (плазмиды, содержащие вставку для лентивирусной трансдукции, были получены из международной базы хранилища плазмид Addgene, *Vmi-1* #12240, *hTERT* #12245) кДНК *hTERT* была клонирована студентом лаборатории Евтушенко Н. А. в плазмиду prGk-loxpr; плазида несет ген устойчивости к пурамицину. Лентивирусная плазида с кДНК *Vmi-1* также была получена из Addgene; данная плазида Amp⁺, не содержит гена устойчивости к антибиотикам в клетках млекопитающих.

С целью получения характеристики первичных и immortalized культур клеток были использованы следующие образцы: кератиноциты:

- d1 – первичные клетки больного ДБЭ,
- d1ТВ – immortalized (трансдукция *hTERT* и *Vmi-1*),
- d2ТВ – immortalized клетки больного ДБЭ (трансдукция *hTERT* и *Vmi-1*),
- d65 – первичные фибробласты или кератиноциты здорового донора (женщины),
- d118Т – спонтанно immortalized кератиноциты здорового донора (трансдукция *hTERT*),

- d137 – кератиноциты здорового донора;

Фибробласты:

- d1 – первичные и immortalized (трансдукция *hTERT*),
- d2 – первичные и immortalized (трансдукция *hTERT*),
- d118 – первичные клетки.

3.5 Анализ образцов кДНК

РНК были выделены из культур клеток, и далее на матрице РНК были получены кДНК. Анализ образцов с помощью маркерных генов проходил с использованием метода полимеразной цепной реакции посредством 5X реакционной смеси ScreenMix-HS с HS Taq ДНК полимеразой с дальнейшим анализом на электрофорезе; ПЦР Real Time со смесью qPCRmix-HS SYBR и ПЦР Real Time с ревертазой MMLV.

Таблица 1. Список используемых в работе праймеров для ПЦР в реальном времени приведен в таблице.

Ген	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
Ezh2	TGTGGAGAGATTATTTCTCAAG	ATCATAACTTTTGCATAGCA
ITIH5	GACTCTGGTGTACACAGTGAAC	CTGATTCAGGAAGTACCC
p63	GACAGGAAGGCGGATGAAGATA	TGTTTCTGAAGTAAGTGCTGGTGC
c-Myс	AGGCATAAGGACTGGGGAGT	TTCCTGGGTTTGGAGTGAGC
hTERT	CCCATTTTCATCAGCAAGTTTGCA	GCGACATCCCTGCGTTCTT
Sox2	GCAGCGTGTACTTATCCTTCA	TGCGAGCCCTGCACAT
Oct4	CACACTCGGACCACATCCTTCT	ACCACACTCGAGCAGATCA
Klf4	GGTCCGACCTGGAAAATGCT	ACCAGGCACTACCGTAAACACA
Nanog	ACAAGTGGCCGAAGAATAGCA	GGTCCCAGTCGGGTTCAC
Col7A	CACCGCCCGACCTGGTGTCCCAA	AAACTTGGGGACACCAGGTCGGGC
TGM1	CCCCCGCAATGAGATCTACA	ATCCTCATGGTCCACGTACACA
TGM3	GGAAGGACTCTGCCACAATGTC	TGCTGACTTCAGGTAAGGAAATCAATT
Krt1	GATGAAATCAACAAGCGGACAA	TGGTAGAGTGCTGTAAGGAAATCAATT
Krt5	AACCGGATGATCCAGAGGCT	GTTCTGCAGATTGGCGCA
Krt16	GATCATTGCGGCCACCAT	TGCTCATACTTGGTCCCTGAAGTCA
Inv	ACTTATTTCCGGTCCGCTAGGT	GAGACATGTAGAGGGACAGAGTCAAG
Lor	GCCGTCCAAATAGATCCCCC	GCAAACCTCGGGTAGCATCA
Flg	ACTTCACTGAGTTTCTTCTGATGGTATT	TCCAGACTTGAGGGTCTTTTCTG
CD-90	CTGСТААСAGTCTTGCAGGT	ACCAGTTTGTCTCTGAGCAC

CD-39	GGACATTCAGGTTGCAAGT	AGCTGAAAATGCCCCAAAATC
FBRS	CATTCAACTCCGGCGCCGT	GGAGGTCCTGTCCTTCTC
S100A4	GCTTCTTGGGGAAAAGGAC	ATTCTTACACATCATGGCG
GM-CFS	GAAACTCAAAGAGAAGGAG	CCCGTTGAATCGTTCTATTTTCTTTG
MGP	GTGTTATGAATCACATGAAAGCA	CTCGGATCCTCTCTTGGAC
HMGB1	AGGTGGAAGACCATGTCTGC	GGAAGAAGGCCGAAGGAGG
Col7Aex111-108	CCCTGGCAAGGAGGGCCT	CTGGCCCTGAAGTCCTTCG
Col7Aex8-9	CGGGTCCTCAGTGGTGGGCCACACA	TCAACAGAAGCGTCAGTGCAGCCATCA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTCTGGTCATGAG
β -Actin	TGCGTTGTTACAGGAAGTCCC	GCTATCACCTCCCCTGTGTG
B2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCACCTCTAAGT

ПЦР проводилась для предварительного анализа работы данных праймеров на образцах кДНК (способность к отжигу, отсутствие образования неспецифических ПЦР-продуктов). На 50 нг кДНК 9 мкл 5X реакционной смеси ScreenMix-HS с HS Taq ДНК (общий объем 10 мкл) полимеразой с помощью амплификатора Bio-Rad T100™ Thermal Cycler. ПЦР-продукты были проанализированы с помощью гель-электрофореза с бромистым этидием и далее были сравнены по длине фрагмента с ожидаемой длиной ампликона.

ПЦР в реальном времени проводилась с помощью амплификатора Bio-Rad ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch, результаты амплификации фиксировались с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.0. Образцы кДНК для реакции были обработаны набором для анализа 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген), в составе которого входит интеркалирующий краситель SYBR green I, HS Taq ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg^{2+} , реакционный буфер. Для постановки ПЦР в смесь объемом 10 мкл требуется добавить праймеры (по 0,5 forward и reverse), 2 мкл буфера qPCRmix, матрицу ДНК и воду. Для анализа экспрессии одного гена в одном образце кДНК ставилось от 3х повторностей. Пробирки с

готовой смесью для ПЦР помещаются в амплификатор и запускается программа амплификации:

1 цикл:	95° С	3 мин
40 циклов:	95° С (денатурация)	10 сек
	60° С (отжиг праймеров)	15 сек
	72° С (элонгация)	30 сек
1 цикл:	72° С	2 мин

Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения используемого прибора для проведения ПЦР. Анализировались кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналу для флуорофора SYBR. Обязательно одновременно с исследуемыми образцами кДНК ставились отрицательные контроли без матрицы («NTC») — реакция для проверки чистоты реактивов от примесей экзогенной ДНК.

Реплики RT PCR анализа, то есть циклы, на которых пришел продукт реакции амплификации ($Ct = \text{Пороговый цикл}$) в одинаковых условиях, усредняются для данного образца и одной пары праймеров, находится стандартное отклонение ($CtSD$). Далее значения сравнивались по формуле $U=2^{(Ct_0-Ct)}$ со стандартным отклонением $USD= X*LN(2)*КОРЕНЬ(CtSD^2+CtSD_0^2)$, где Ct_0 — среднее значение всех реплик генов домашнего хозяйства (*GAPDH*, *B2M*, *β -actin*), $CtSD_0$ — стандартное отклонение Ct_0 . По данным полученным расчетам были построены гистограммы, чтобы наглядно продемонстрировать и сравнить результаты.

3.6 Иммуногистохимия

Были использованы срезы кожи от пациентов больных БЭ d5a, d11 и здорового донора (норма), полученные на микротоме HM525 (Thermo Fisher): толщина срезов 5 мкм, заливочная среда для резки образцов на микротоме Реагент Tissue-Tek OCT Compound; предметное стекло с покрытием Menzel

Superfrost plus и покровные стекла Menzel разных размеров. Окрашивание проводили по следующему протоколу:

- 1) Отмыть срезы от криопротектора в PBS 3 раза по 5 мин.
- 2) Для фиксации срезы проинкубировать в 10% формалине 10 мин, и далее промыть в PBS 3 раза по 5 мин.
- 3) На каждую группу срезов на предметное стекло нанести раствор с одним первичным антителом. Срезы проинкубировать с первичными моноклональными рекомбинантными антителами кролика на плектин, цитокератин 14 и цитокератин 5 (Abcam) в блокирующем буфере на основе PBS (PBS: 1.7mM KH_2PO_4 , 5.2mM Na_2HPO_4 , 150mM NaCl) во влажной камере в течение ночи при +4°C. Антитела к цитокератину 5 были конъюгированы с меткой Alexa Fluor 488. Состав блокирующего буфера: PBS, 0,3% Triton X-100, 10% стерильно отобранной сыворотки FBS (фетальная бычья сыворотка, HyClone, США). Антитела разведены в блокирующем растворе в соотношениях: 1:150 Krt5, 1:500 Krt14, 1:250 Plectin.
- 4) Срезы промыть PBS 3 раза по 10 мин.
- 5) Области, анализируемые на K14 и плектин, проинкубировать со вторичными поликлональными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США) в разведении 1:500 в блокирующем буфере на PBS в темном месте 2 часа.
- 6) Промыть PBS 3 раза по 5 мин.
- 7) Контрастная окраска ядер: инкубирование в Dapi (Biotum, США), разведенном 1:500 в концентрации 2,5 мг/мл в PBS 15 мин; срезы промыты PBS 3 раза по 5 мин.
- 8) Заключение срезов под покровное стекло в 50% глицерин.

Проверка качества срезов на этапах проводилась на микроскопе Primo Star Zeiss. Фотографии были получены на конфокальном микроскопе Zeiss Axio Observer Z1. Полученные фотографии срезов кожи здорового донора и больных

БЭ после иммуногистохимического окрашивания были обработаны в программах Photoshop и Fiji.

Также было проведено окрашивание трех иммортализованных культур клеток: фибробласты d1, иммортализованные hTERT; кератиноциты d1 и d2, иммортализованные hTERT и Vmi1. Окрашивание проводилось подобным образом, как описано выше, на основе PBS, который использовался также как промывочный раствор. Клетки инкубировались с первичными моноклональными рекомбинантными антителами мыши против Vmi1 (1:1000; Abcam) и антителами кролика против реверсной транскриптазы hTERT (1:1000; Abcam) в блокирующем буфере. Вторичные поликлональные антитела для Vmi1 использовались Goat Anti-Mouse IgG (H+L), для hTERT - Goat Anti-Rabbit IgG (H+L). Фотографии клеток также были получены на конфокальном микроскопе Zeiss Axio Observer Z1.

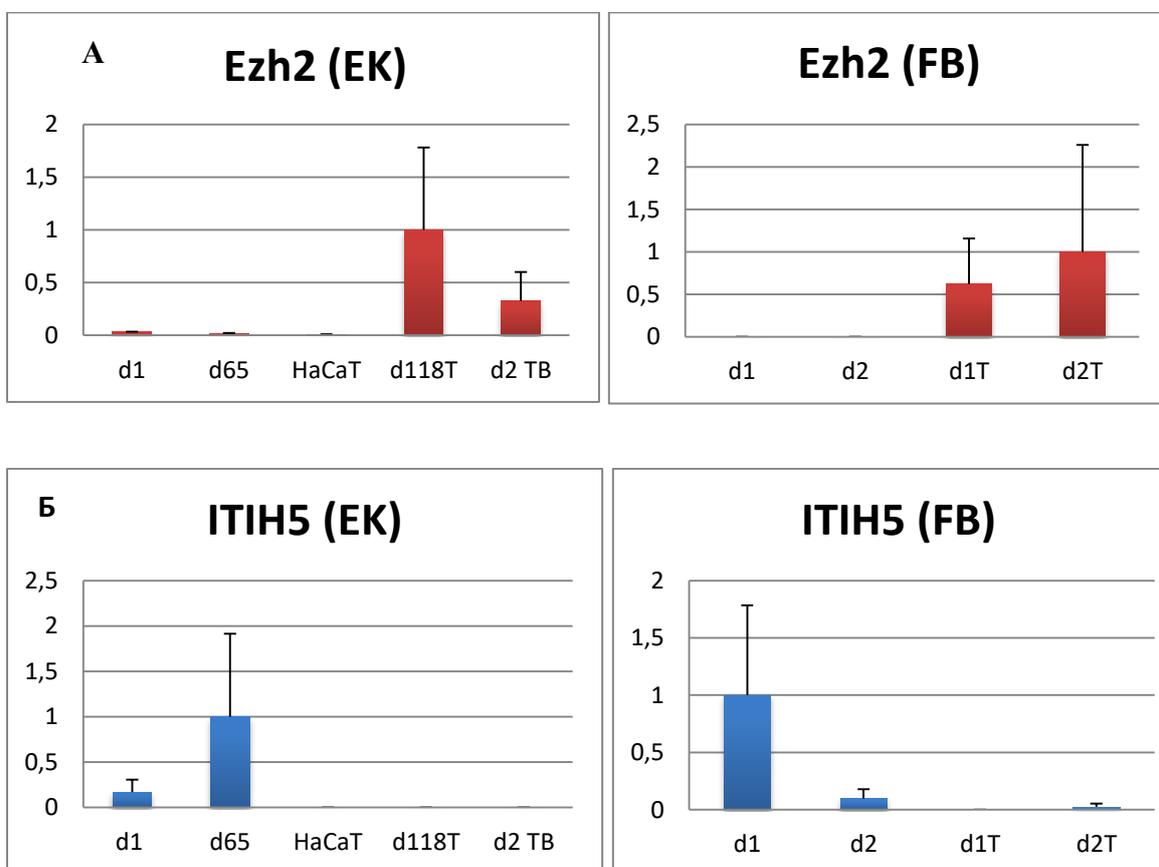
4 Результаты

4.1 Характеристика клеточных линий

4.1.1 Анализ с помощью RT PCR

В результате ряда проведенных RT PCR были получены следующие данные по экспрессии генов в кератиноцитах и фибробластах. По полученным результатам были построены гистограммы; в тексте указаны те пороговые значения циклов ПЦР, для которых можно было рассчитывать на начало экспоненциального периода накопления специфического ампликона (максимальное число циклов 40).

Первый блок анализируемых генов был подобран исходя из характерных особенностей, появляющихся у иммортализованных клеток. Предполагается повышение экспрессии онкогенов, а также факторов, отвечающих за прямое или косвенное повышение активности hTERT.



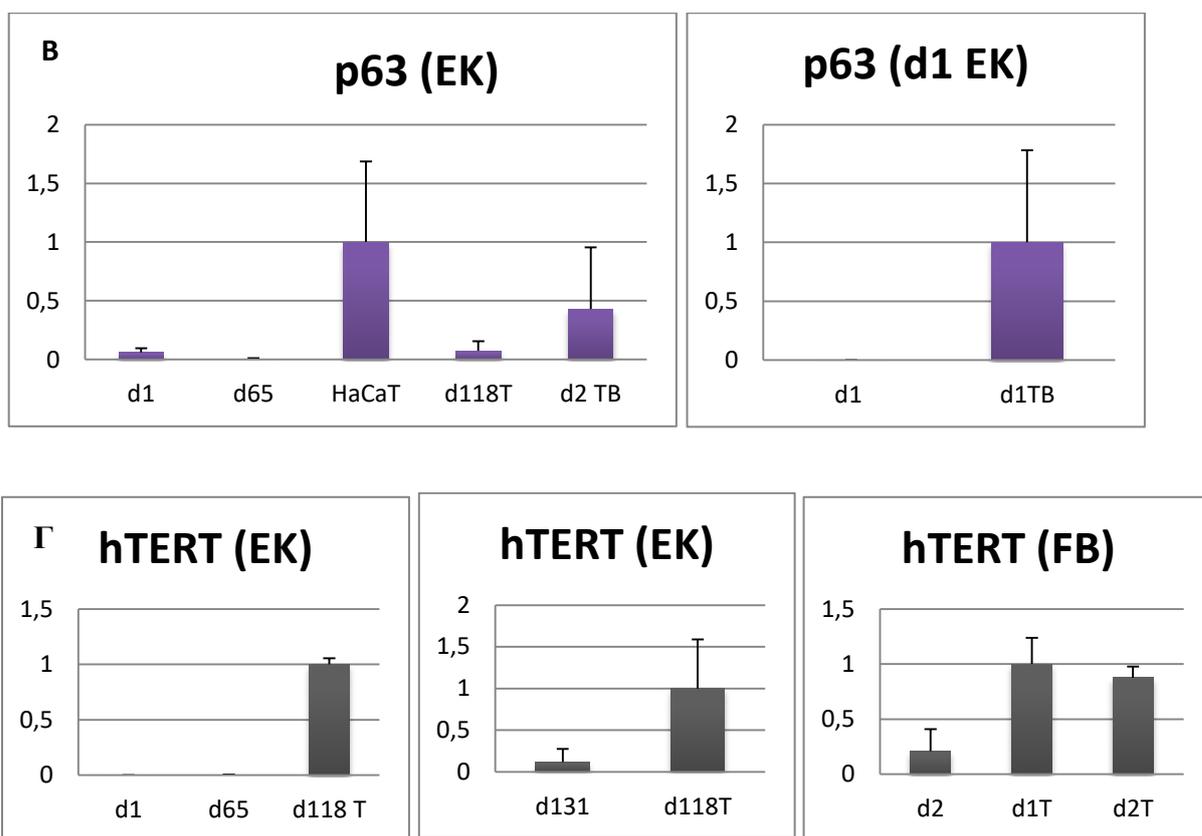


Рисунок 9. Гистограммы, полученные в результате RT PCR анализа различных линиях кератиноцитах и фибробластов: первичные d1, d2, d65; immortalized d1TB, d2T, d118T и HaCaT.

Экспрессия *Ezh2*, супрессора метастазирования, повышается в immortalized культурах по сравнению с первичными культурами клеток. На гистограммах видно, что экспрессия данного гена повышена в immortalized культурах кератиноцитов d118T (для данного ампликона пороговым значением циклов было 26, в сравнении с B2M, преодолевшим порог на 20 цикле), d2TB (30 цикл, B2M – 24 цикл) и фибробластов d1T (36 цикл, GAPDH – 23) и d2T (35 цикл, GAPDH – 26). Интересно, что этого повышения экспрессии не наблюдается в immortalized культуре клеток HaCaT (36 цикл, средний преодолевший порог для GAPDH и B2M – 21 цикле). Первичные EK: d1 – 31 цикл (B2M – 22), d65 – 32 цикл (B2M – 25); в первичных Fb d1 и d2 экспрессия *Ezh2* отсутствует (Рис.9, А).

ITIH5, еще один рассматриваемый супрессор метастазирования, экспрессия которого, как показывают результаты, снижается в

иммортизированных культурах клеток ЕК d118Т (пороговое значение циклов было 37, для В2М – 20), в d2Т и НаСаТ экспрессия отсутствует (В2М – 24 цикл и 21 цикл соответственно), Fb d1Т (30 цикл, GAPDH – 26), d2Т (32 цикл, GAPDH – 23). Нормальные ЕК: d1 преодолел порог на 31 цикле, В2М на 22, d65 – 31 цикл, В2М – 22. Также мы наблюдаем сниженную экспрессию ITIH5 в культуре кератиноцитов d1 (30 цикл, GAPDH – 26) по сравнению со схожей линией d2 (30 цикл, GAPDH – 23) (Рис.9, Б).

Экспрессия *p63* проанализирована на кератиноцитах, для которых он характерен. Результаты показывают, что экспрессия *p63* повышается в иммортизированных культурах клеток; при данных соотношениях можно отчетливо увидеть, что наиболее велико его содержание в клетках НаСаТ (пороговое значение циклов – 22 цикле, GAPDH – 21); первичные d1 – 22 цикл (GAPDH – 19), d65 – 28 цикл (GAPDH – 19 цикл); иммортизированные d1ТВ – 28 цикл (GAPDH – 26), d2 ТВ – 26 цикл (GAPDH – 22 цикл), d118Т – 36 цикл (GAPDH – 28 цикл) (Рис.9, В).

hTERT – прослеживается закономерность повышенной экспрессии гена в иммортизированных клетках: низкая экспрессия в культурах первичных ЕК больных d1, здоровых доноров d65 и d131 и Fb d2 (d1 – 37 цикл, GAPDH – 19, β -актин – не появился, d65 – 37 цикл, GAPDH – 19, β -актин – 21, d118Т – 30 цикл, GAPDH – 19, β -актин – 19; d131 преодолел порог на 33 цикле, GAPDH на 25, d118Т – 26, GAPDH на 21; d2 – 36, GAPDH на 29, d1Т – 27, GAPDH на 24, d2Т – 27, GAPDH на 24 (Рис.9, Г).

Следующий блок рассматриваемых генов - маркеры плюрипотентности, факторы Яманака для ИПСК.

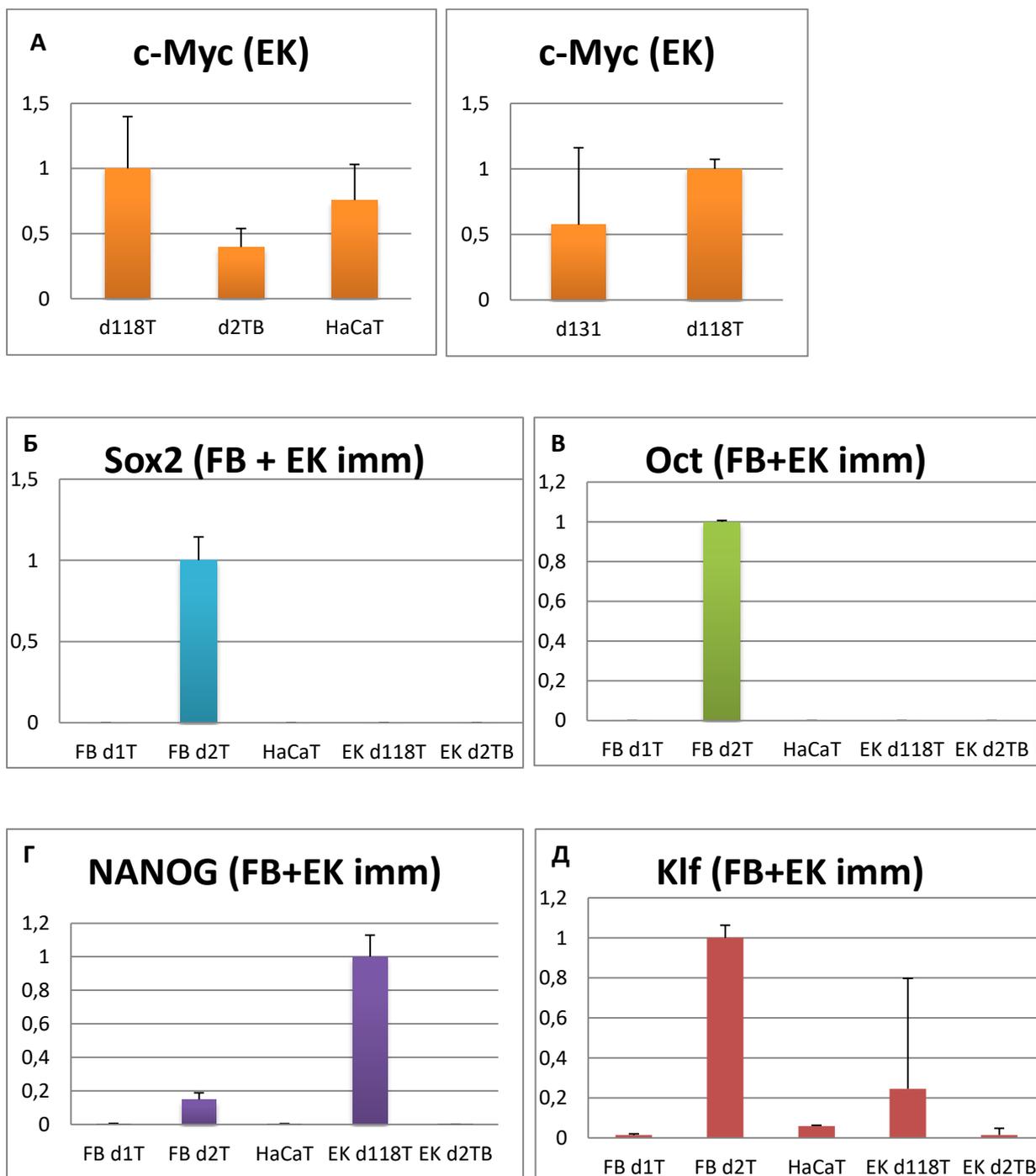


Рисунок 10. Гистограммы, полученные в результате RT PCR анализа первичных кератиноцитов от здорового донора d131 и иммортализованных HaCaT, d2TB, d118T и фибробластов d1TB, d2T.

Экспрессия онкогена *c-Мyc* по полученным данным повышена у иммортализованных культур (ЕК: d118T – пороговое значение 28 цикл, GAPDH

– 15 цикл, d2TB – 30 цикл, GAPDH – 20 цикл, HaCaT – 32, GAPDH – 21 цикле). Причем, в линии спонтанно иммортализованных кератиноцитов d118T оказалась наибольшая экспрессия данного гена (d118T – пороговое значение 24,5 цикл, GAPDH – 21). Контроль с первичной культурой клеток – EK d131 (29 цикл, GAPDH – 25) (Рис.10, А).

Sox2 и *Oct4* – по результатам RT PCR анализа обнаружилось, что экспрессия данных генов повышена только в культуре иммортализованных клеток фибробластов d2TB (*Sox2* преодолел порог на 33 цикле, *Oct4* на 30 цикле, GAPDH на 20 и β -актин на 22), в остальных культурах (Fb d1T *Sox2* преодолел порог на 27 цикле, *Oct4* на 27 цикле, GAPDH на 15 и β -актин на 22; EK HaCaT *Sox2* на 30 цикле, *Oct4* на 29 цикле, GAPDH на 22 и β -актин на 19, d2TB *Sox2* на 28 цикле, *Oct4* на 27 цикле, GAPDH на 25 и β -актин на 22, d118T *Sox2* на 26 цикле, *Oct4* на 25 цикле, GAPDH на 15) экспрессия *Sox2* и *Oct4* снижена (Рис.10, Б, В).

Экспрессия *NANOG* обнаружена преимущественно в Fb d2TB (29 цикл, GAPDH – 24) и EK d118T (24 цикл, GAPDH – 15). Аналогичные результаты и в случае с *Klf4*: Fb d2TB – 28 цикл, EK d118T – 29 цикл. Остальные культуры: Fb d1T *NANOG* – 28, *Klf4* – 28, GAPDH - 15, β -актин – 22, EK d1TB *NANOG* – 31, *Klf4* – 29, GAPDH – 15, актин – 22, HaCaT *NANOG* – 29, *Klf4* – 25, GAPDH – 22, актин – 19 (Рис.10, Г, Д).

Следующим этапом была проверка на содержание мРНК генов, кодирующих маркерные белки фибробластов.

Помимо подтверждения наличия у иммортализованных линий маркерных генов фибробластов, то есть сохранения ими паттерна дифференцировки, некоторые гены подобраны таким образом, чтобы выявить возможные отличия подтипов дермальных фибробластов: ретикулярных или папиллярных составляющих дермы.

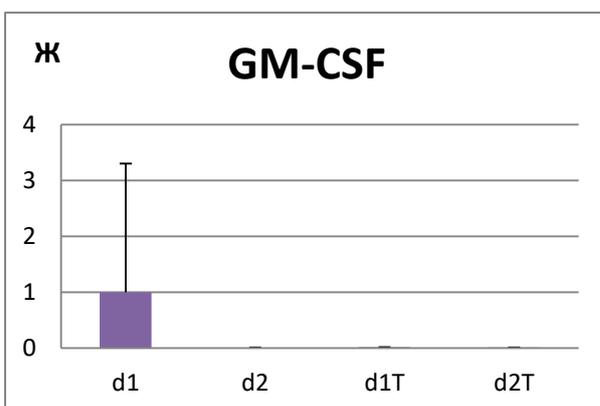
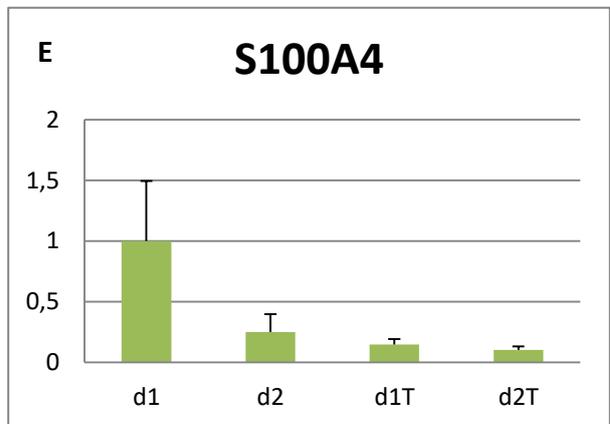
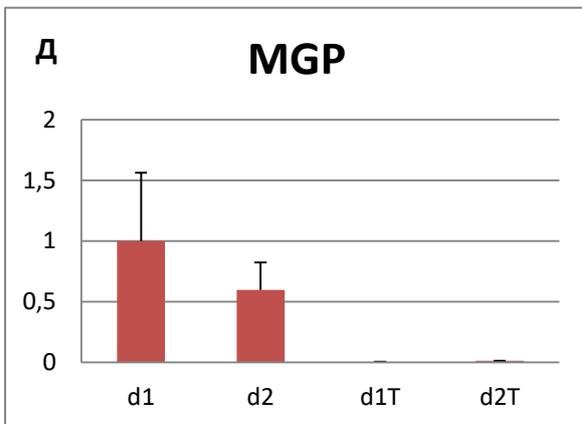
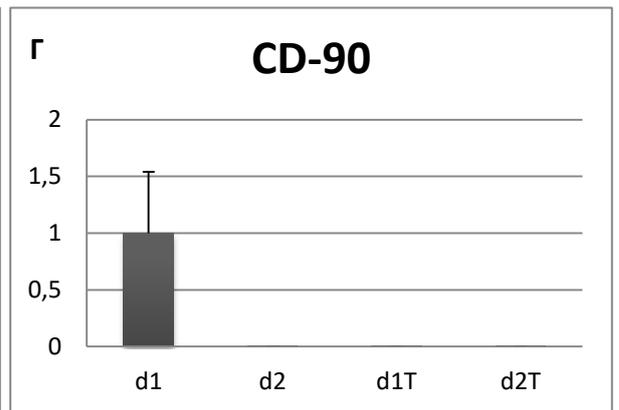
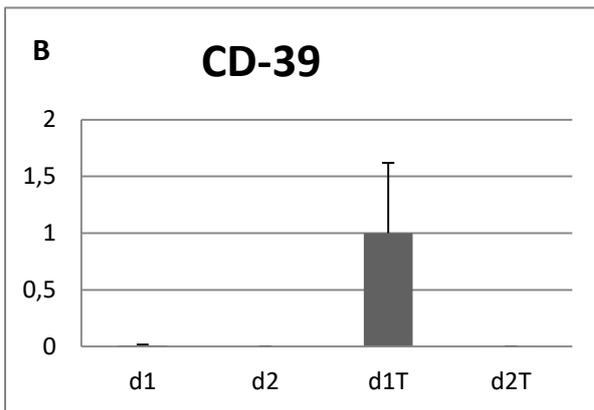
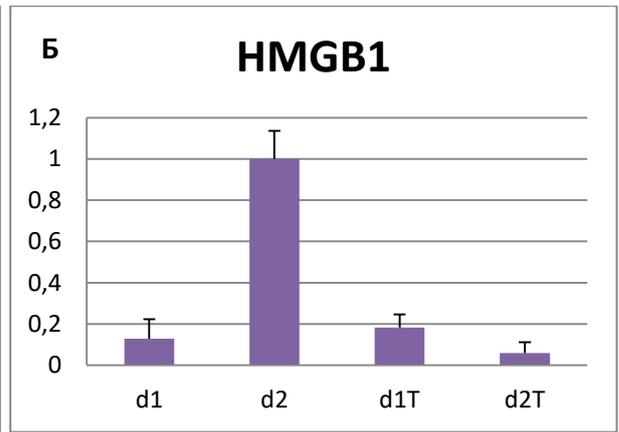
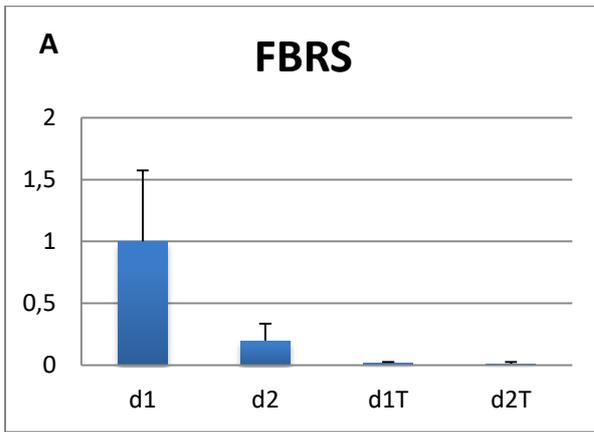


Рисунок 11. Гистограммы, полученные в результате RT PCR анализа экспрессии генов, кодирующих маркерные белки фибробластов, в первичных и иммортализованных фибробластах больных БЭ.

FBRS – экспрессия представлена у первичных фибробластов, у иммортализованных заметно снижена: первичные фибробласты d1 – 29 (среднее по GAPDH и β -актину – 27) и d2 – 28 (среднее по GAPDH и β -актину – 23), d1T – 33 (среднее по GAPDH и β -актину – 25), d2T – 32 (среднее по GAPDH и β -актину – 23) (Рис.11, А).

Экспрессия *HMGB1* обнаружена в первичных фибробластах d1 и d2 (В d1 примерно в 10 раз меньше экспрессия *HMGB1*), а также наблюдается некоторое повышение его экспрессии в иммортализованных d1T, но снижение в иммортализованных d2T: для первичных Fb *FBRS* d1 пришел на 30 цикле, GAPDH на 29, d2 на 32, GAPDH на 29, β -актин на 30, для иммортализованных Fb d1T на 27, GAPDH на 24, β -актин на 21, d2T на 26, GAPDH на 24, β -актин на 22 (Рис.11, Б).

CD90 – маркерный белок ретикулярного слоя дермы фибробластов. Экспрессия кодирующего его гена по результатам RT PCR обнаружен в культуре первичных фибробластов d1 (*CD90* 22 цикл, среднее по GAPDH и *B2M* – 27 цикл; *CD39* преодолел порог на 30 цикле, среднее по β -актину и *B2M* – 26). Экспрессия *CD39* (гена, кодирующего маркерный белок папиллярного слоя) обнаружена только в культуре иммортализованных фибробластов d1T (*CD39* – 22 цикл, среднее по β -актину и *B2M* – 24; *CD90* преодолел порог на 30 цикле при среднем значении перехода порога GAPDH и *B2M* на 23 цикле). В остальных культурах для данного ампликона пороговое значение было на довольно поздних циклах: первичные Fb d2 *CD90* – 37 (среднее по GAPDH и *B2M* – 29), *CD39* – отсутствует, иммортализованные Fb d2T *CD90* – 30 (среднее по GAPDH и *B2M* – 23), *CD39* – 36 (среднее по β -актину и *B2M* – 28). По данным результатам видим, что при иммортализации начинает экспрессироваться маркер *CD39*, характерный для папиллярного слоя, а экспрессия *CD90*, наоборот, снижается (Рис.11, В, Д).

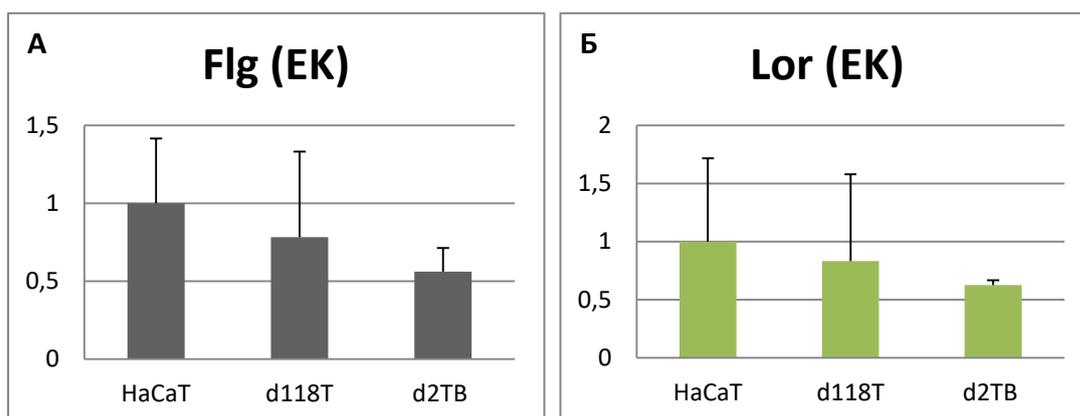
MGP – типичный маркер ретикулярных фибробластов, его экспрессия представлена в первичных фибробластах, но не в иммортализованных: для

первичных Fb MGP d1 пороговое значение ампликона было на 34 цикле, GAPDH – 29, d2 на 37 цикле, GAPDH – 29, β -актин – 30, для immortalized Fb d1T порог – 32 цикл, GAPDH – 24, β -актин – 21, d2T на 30 цикле, GAPDH – 24, β -актин – 22 (Рис.11, Д).

S100A4 – классический маркер фибробластов. По полученным данным экспрессия снижена в immortalized культурах, особенно в культуре d2T: для первичных Fb S100A d1 порог преодолен на 29 цикле, GAPDH – 29, d2 на 34 цикле, GAPDH – 29, β -актин – 30, для immortalized Fb d1T порог – 26 цикл, GAPDH – 24, β -актин – 21, d2T – порог 26 цикл, GAPDH – 24, β -актин – 22 (Рис.11, Е).

Повышенная экспрессия *GM-CSF* наблюдается только в d1 фибробластах (24 цикл, среднее по GAPDH и B2M – 27 цикл). При immortalization (в обоих случаях) его экспрессия заметно снижается: d2 – 33, d1T – 26, d2T – 26 цикл (Рис.11, Ж).

Рассмотрим результаты по следующей группе генов, кодирующих маркеры кератиноцитов.



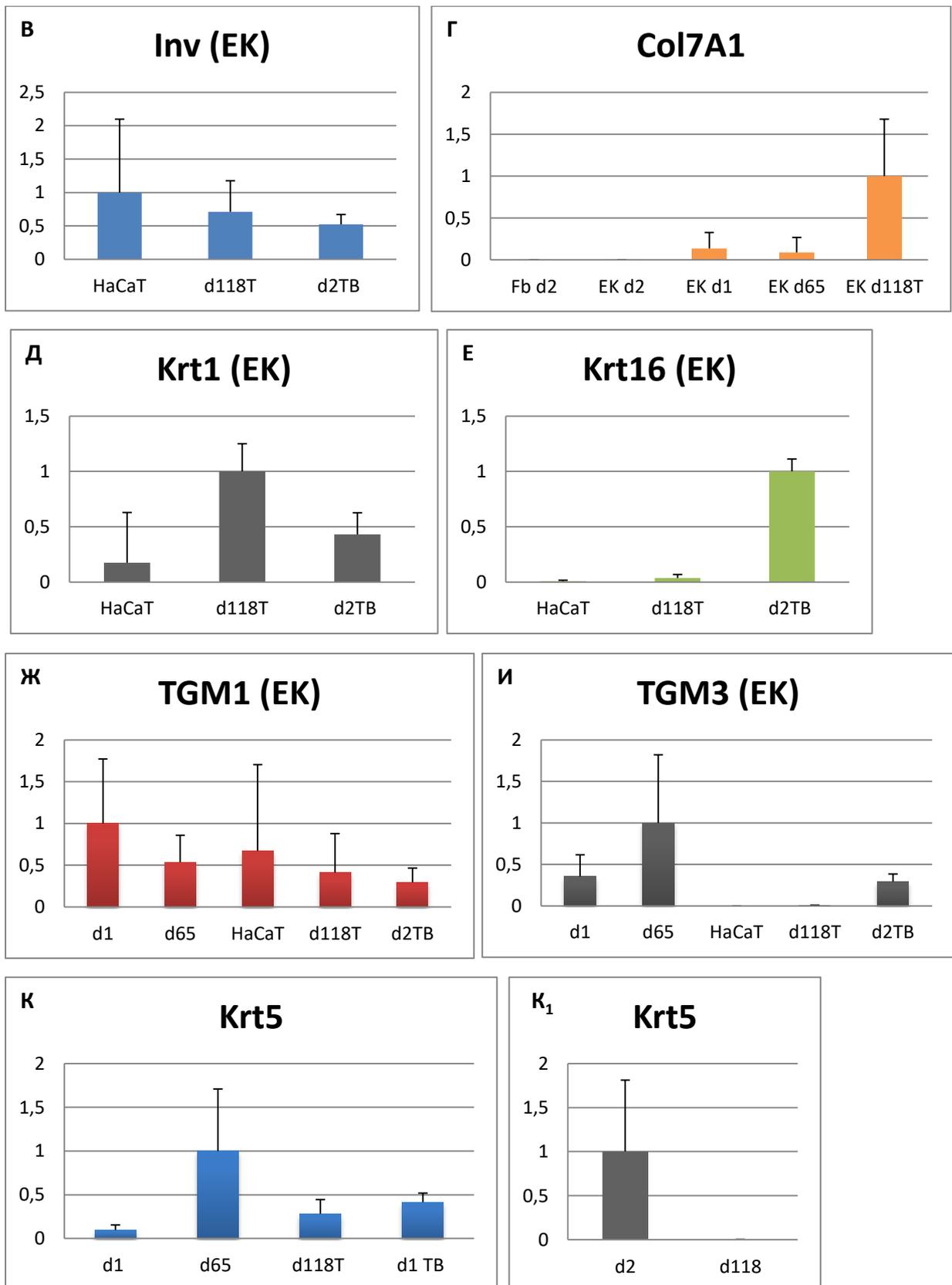


Рисунок 4. Гистограммы, полученные в результате RT PCR анализа экспрессии генов, кодирующих маркерные белки кератиноцитов, в первичных ЕК здоровых d65, больных БЭ d1, иммортализованных ЕК в 118Т, d2TB, HaCaT, и в двух линиях первичных Fb d2 и d118 (К₁).

Экспрессия филаггрина (*Flg*), инволюкрина (*Inv*) и лорикрина (*Lor*) в иммортализованных линиях кератиноцитов HaCaT, d2TB и d118T присутствует: для HaCaT филаггрин преодолел барьер на 30 цикле, лорикрин на 34 цикле, инволюкрин на 32 цикле с пришедшим GAPDH на 21 и β -актином на 20 цикле; для d2TB филаггрин на 32 цикле, лорикрин на 35 цикле, инволюкрин на 34 цикле с пришедшим GAPDH на 16 и β -актином на 15 цикле; для d118T филаггрин преодолел барьер на 27 цикле, лорикрин на 31 цикле, инволюкрин на 29 цикле с пришедшим GAPDH на 20 и β -актином на 20 цикле (Рис.12, А, Б, В).

Коллаген 7 (*Col7a1*) – наблюдается его низкая экспрессия в первичных кератиноцитах больных (ЕК d1 на 35 цикле, β -актин на 23 цикле; d2 на 35 цикле, GAPDH на 23 цикле) и здорового донора d65 (31 цикл, β -актин на 26 цикле), а также в культуре первичных фибробласт Fb d2 (38 цикл, β -актин на 15 цикле) в сравнении с контрольной группой клеток здорового донора d118T (ген преодолел порог на 25 цикле, β -актин – 17 цикл) (Рис.12, Г).

K1 (*Krt1*) – наиболее высокая экспрессия наблюдается в культуре d118T (28 цикл, GAPDH – 20 цикл), далее d2TB (33 цикл, GAPDH – 16 цикл) и далее HaCaT (34 цикл, GAPDH – 21 цикл) (Рис.12, Д).

K16 (*Krt16*) – из трех представленных иммортализованных культур высокая экспрессия видна только у d2TB (25 цикл, GAPDH – 16 цикл в сравнении с 32 циклом d118T (GAPDH 20 цикл) и 26 циклом HaCaT (GAPDH 21 цикл)) (Рис.12, Е).

Судя по данным по экспрессии трансглутаминаз, в HaCaT и d118T отсутствует экспрессия TGM3, в отличие от других культур (d1 на 31 цикле, В2М на 22; d65 на 33 цикле, В2М на 25; d2TB В2М на 24; d118T В2М на 20; HaCaT на 29 цикле, В2М на 21), а TGM1 в норме (d1 на 27 цикле, В2М на 22; d65 на 31 цикле, В2М на 25; d2TB на 31 цикле, В2М на 24; d118T на 27 цикле, В2М на 20; HaCaT на 29 цикле, В2М на 21) (Рис.12, Ж, И).

Уровень мРНК гена *Krt5* снижено экспрессируется в культуре первичных кератиноцитов d1 и довольно низко в обеих рассматриваемых группах

иммортиализованных клеток d1T и d2T (d1 на 19 цикле, GAPDH на 26; d65 на 16 цикле, GAPDH на 19; d1TB на 23 цикле, GAPDH на 26; d118T на 22 цикле, GAPDH на 24). Уровень экспрессии *Krt5* повышен относительно остальных данных для культуры иммортиализованных фибробластов d2T (d2T FB на 18 цикле, GAPDH на 23 цикле) (Рис.12, К). Данный ген был рассмотрен для первичных клеток фибробластов больных БЭ d2 и фибробластов здорового донора d118: для d118 наблюдается низкая экспрессия *Krt5* (36 цикл, GAPDH на 24 цикле), а в культуре d2 заметно повышение экспрессии *Krt5* (28 цикл, GAPDH на 23 цикле) (Рис.12, К₁).

4.2 Иммуногистохимическое окрашивание

4.2.1 Анализ распределения Vmi1 и hTERT иммортиализованных культур клеток

В результате иммуногистохимического окрашивания первичными моноклональными рекомбинантными антителами мыши против Vmi1 (1:1000; Abcam) и антителами кролика против реверсной транскриптазы hTERT (1:1000; Abcam) и далее вторичными поликлональными антителами для Vmi1 – Goat Anti-Mouse IgG (H+L), для hTERT - Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), были получены фотографии на конфокальном микроскопе иммортиализованных культур клеток больных БЭ d1 и d2.

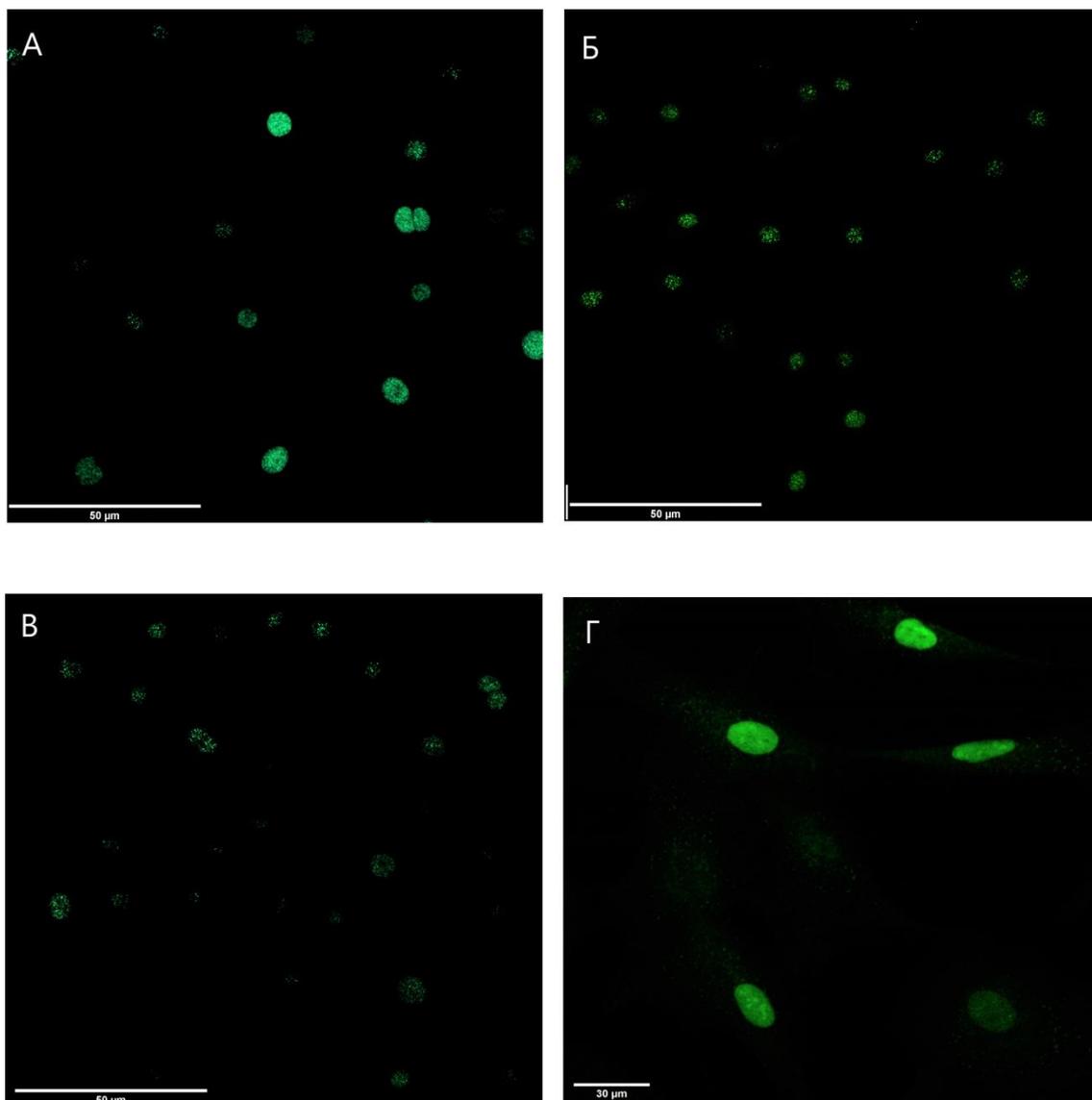


Рисунок 13. Фотографии образцов, окрашенных методом иммуногистохимии, полученные на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 880: А. Культура кератиноцитов больных БЭ d1, антителами против hTERT и Vmi-1 с красителем Alexa 488; Б. Культура кератиноцитов больных БЭ d2, антитела против hTERT Vmi-1 с красителем Alexa 488; В. Культура кератиноцитов больных БЭ d1, anti-VMI, Alexa 488; Г. Культура фибробластов Fb d1, антитела против hTERT, Alexa488.

На рисунке 13, А и Б представлены кератиноциты d1 и d2 соответственно, окрашенные антителами anti-hTERT и Vmi-1. Можно увидеть присутствие и расположение белка, точки его наибольшей концентрации (локализация преимущественно в ядре). В случае ЕК d2 белок hTERT окрасился меньше, чем в культуре d1. Обе линии кератиноцитов были подвержены одинаковым способам иммортализации (трансдукция hTERT и Vmi1 лентивирусами со

второй системой сборочных плазмид (pMDG, pR87)). Отдельно окрашенные Vmi-1 и hTERT мы видим на рисунках 13, В и Г соответственно. На рисунке 13, Г видна морфология фибробластов, то есть вытянутые веретеновидные клетки.

4.2.2 Анализ распределения экспрессии структурных белков в образцах кожи от здорового донора и больных ВБЭ с неизвестной мутацией.

После получения образцов кожи больных БЭ (доноров d5a и d11) и здорового донора (контроль), были сделаны срезы (5 мкм), которые затем были окрашены методом иммуногистохимического окрашивания первичными специфичными моноклональными рекомбинантными антителами кролика против структурных белков дермо-эпидермального соединения (цитокератины 5 и 14, плектин - Abcam), вторичными поликлональными антителами Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, конъюгированными с Alexa Fluor 488 (Invitrogen, США), и красителем DAPI (Biotum, США). Данные результаты были получены совместно с Корчивой Е.С.

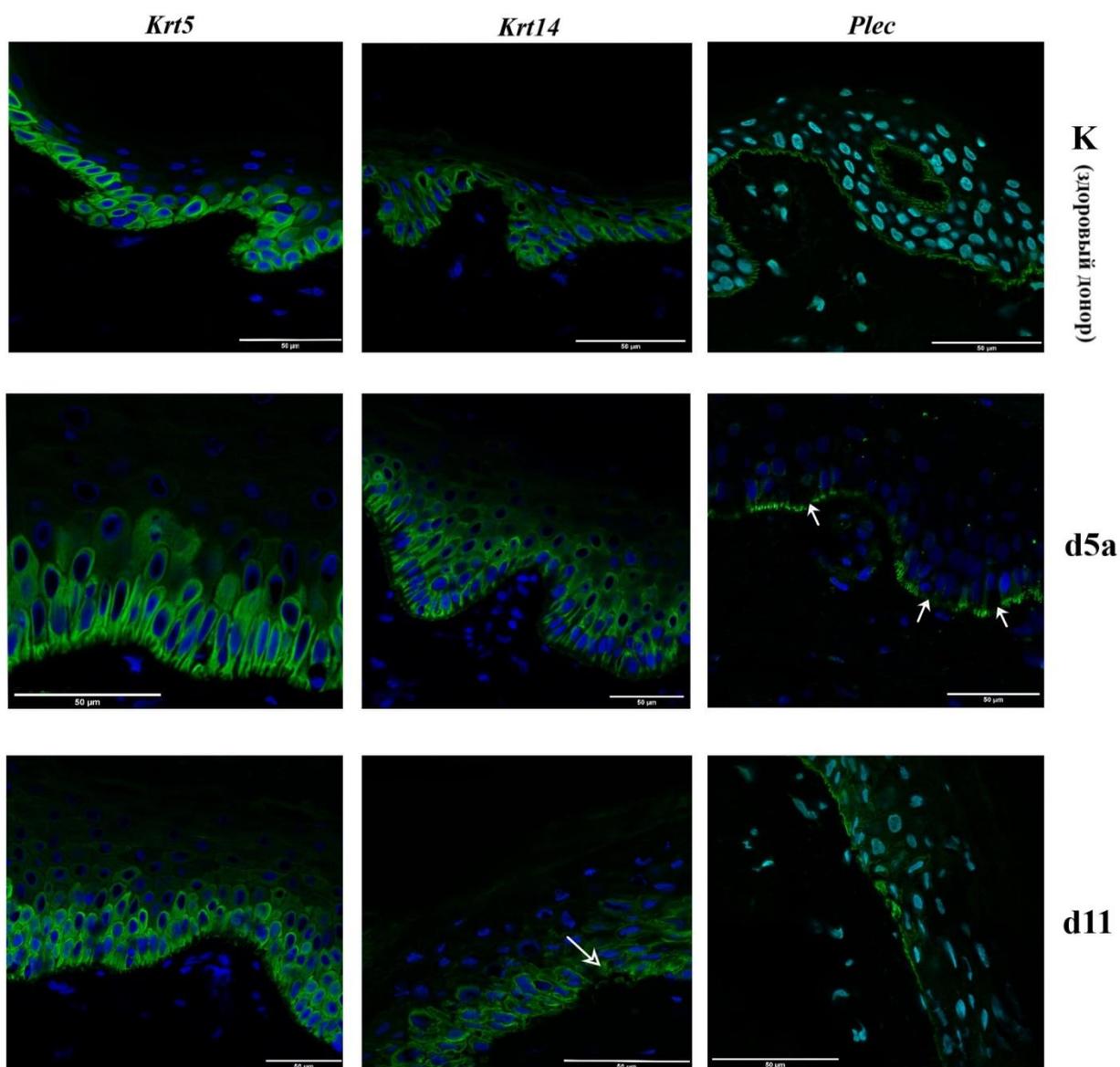


Рисунок 14. Окраска специфичными антителами срезов кожи (слои эпидермиса и дермы) на кератин 5 (Krt5), кератин 14 (Krt14) и плектин (Plect) (Alexa 488), дополненные красителем ядер DAPI. d5a и d11 – доноры кожи, больных БЭ, К – срезы кожи здорового донора. Стрелками отмечено нарушение экспрессии белка. Фотографии были сделаны на Конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss LSM 880 на объективе 63x с иммерсионным маслом.

Интенсивность экспрессии кератинов K5 и K14, судя по данным фотографии (Рис.14), наибольшая в нижних слоях эпидермиса (базальном и шиповатом слоях), и далее уменьшается с увеличением количества слоев кератиноцитов.

Визуальная оценка паттерна экспрессии K14 в контроле показывает его равномерное расположение преимущественно в нижних слоях эпидермиса. В

краевой цитоплазме клеток у d11 в сравнении со здоровым контролем наблюдается неравномерная экспрессия K14 и возможное образование агрегатов белка в краевой цитоплазме (см ближе рис.15). Однако сделать на основании этого наблюдения какие-либо выводы мы не можем.

На срезах d5a агрегатов не наблюдается. Для K5 не замечена разница в паттерне экспрессии в коже у больных доноров d5a и d11 по сравнению со здоровым контролем.

Окрашивание кожи антителами против плектина показало измененный паттерн экспрессии плектина у доноров d5a и d11 (результаты сравнивались с результатами авторов статьи Natsuga, 2010). Для донора d11 отмечено визуальное ослабление интенсивности окраски против плектина по сравнению с нормальным донором, свечение в d5a представляло прерывистую линию, что говорит о неравномерности экспрессии белка.

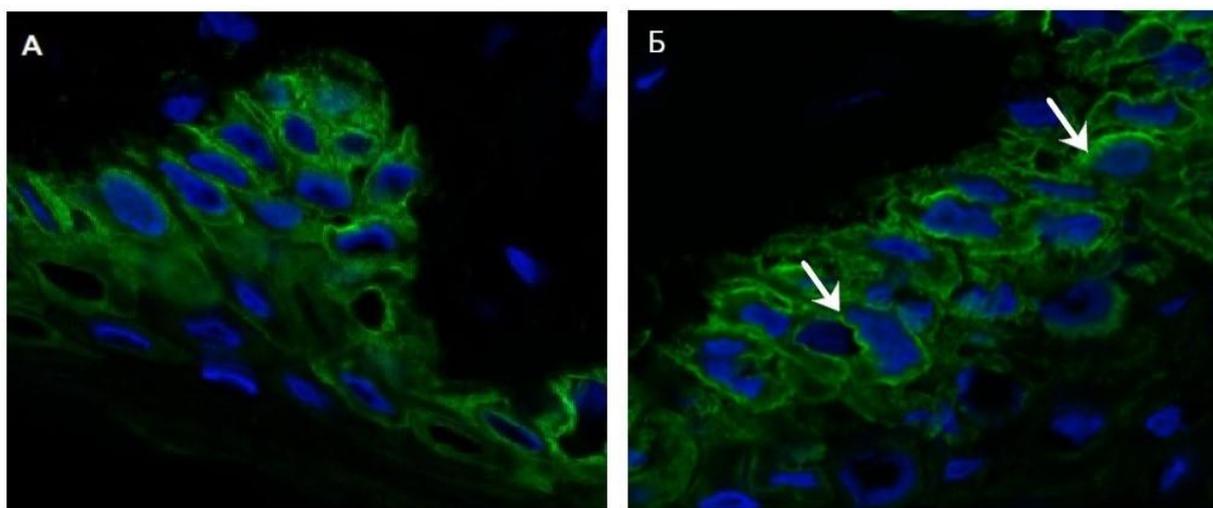


Рисунок 15. Увеличенные фрагменты фотографий срезов кожи: наличие агрегатов K14 (указаны стрелками) у клеток d11 (Б) по сравнению с их отсутствием у здорового контроля (А).

4.3 Получение вектора CMV pL4 puro Vmi-1

В результате секвенирования по Сэнгеру (компания Евроген) четырех плазмид (содержащих предположительно кДНК Vmi-1) были получены следующие последовательности:

А	Query	236	CCCCTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGA	295
	Sbjct	3657	CCCCTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGA	3716
	Query	296	GAAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAG	355
	Sbjct	3717	GAAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAG	3776
	Query	356	CAGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTA	415
	Sbjct	3777	CAGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTA	3836
	Query	416	CTTACGATGCCCAGCAGCAATGGCTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAAT	475
	Sbjct	3837	CTTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAAT	3896
	Query	476	GGACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTA	535
	Sbjct	3897	GGACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTA	3956
	Query	536	CTACACGCTGATGGACGTTGCCCTACATTTATACCTGGAGAAGAAATGGCCCACTACCTTT	595
	Sbjct	3957	CTACACGCTAATGGACATTTGCCCTACATTTATACCTGGAGAAGAAATGGCCCACTACCTTT	4016
Б	Query	186	GLFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLD	365
	Sbjct	95	GLFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLD	154
	Query	366	RkvnkekpkeevndkRYLRCPAAMAVMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYTYL	545
	Sbjct	155	RKVNKEKPKEEVNDKRYLRCPAAM VMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYTYL	214
	Query	546	MDVAYIYTWRRNGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQDGLTNAGELESDSGSDKANS PAGGVp	725
	Sbjct	215	MDIAYIYTWRRNGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQDGLTNAGELESDSGSDKANS PAGGVp	274
	Query	726	stssclpsspstpVQSPHPQFPFHSSTMNGTSNSPSANHQSSFASRPRK	869
	Sbjct	275	STSSCLPSPSTPVQSPHPQFPFHSSTMNGTSNSPSANHQSSFASRPRK	322

Рисунок 16. А. - нуклеотидная последовательность участка гена *Bmi-1*, полученная в результате секвенирования по Сенгеру вектора CMV pL4 puro *Bmi-1* №1; Б – аминокислотная последовательность данного фрагмента.

№1 (Рис.16). 99% сходства с геном *Mus musculus Bmi1 polycomb ring finger oncogene (Bmi1), transcript variant X2*; представлен фрагмент нуклеотидной последовательности сиквенса (выше), сравненного с нуклеотидной последовательностью гена *Bmi1*, и ниже аминокислотная последовательность нашего клона и polycomb complex protein *BMI1 [Mus musculus]*. Произошла замена, вероятно в процессе ПЦР, в 396 положении аминокислоты (замена треанина на аланин).

A	178	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTTATGCAGCTCAC	237
	3598	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTTATGCAGCTCAC	3657
	238	CCGTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	297
	3658	CCGTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	3717
	298	AAGAGGATTATATCTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAGC	357
	3718	AAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAGC	3777
	358	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTAC	417
	3778	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTAC	3837
	418	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAAATG	477
	3838	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAAATG	3897
	478	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	537
	3898	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	3957
Б	Query 187	GLFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIISDDEIISLSIEFFDQSRLD	366
	Sbjct 85	GLFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLD	144
	Query 367	RkvnkekpkeevndkRYLRCPAAMTMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYYTL	546
	Sbjct 145	RKVNKEKPKEEVNDKRYLRCPAAMTMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYYTL	204
	Query 547	MDIAYIYTWRNRGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQRDGLTNAGELESDSGSDKANSPAGGVP	726
	Sbjct 205	MDIAYIYTWRNRGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQRDGLTNAGELESDSGSDKANSPAGGVP	264
	Query 727	stssclpsspstpVQSPHPQFPHISSTMNGTSNSHNSANHQSSF 852	
	Sbjct 265	STSSCLPSPSTPVQSPHPQFPHISSTMNGTSNS SANHQSSF 306	

Рисунок 17. А. - нуклеотидная последовательность участка гена *Bmi-1*, полученная в результате секвенирования по Сенгеру вектора CMV pL4 puro *Bmi-1* №2; Б – аминокислотная последовательность данного фрагмента.

№2 (Рис.17). 99% сходства с геном *Mus musculus Bmi1 polycomb ring finger oncogene (Bmi1), transcript variant X2*; представлен фрагмент нуклеотидной последовательности сиквенса (выше), сравненного с нуклеотидной последовательностью гена *Bmi1*, и ниже аминокислотная последовательность нашего клона и polycomb complex protein *BMI1 [Mus musculus]*. Произошла замена, вероятно в процессе ПЦР, в 844 положении аминокислоты (замена пролина на гистидин).

A	Query	180	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTTATGCAGCTCAC	239
	Sbjct	3598	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTTATGCAGCTCAC	3657
	Query	240	CCGTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	299
	Sbjct	3658	CCGTCAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	3717
	Query	300	AAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAGC	359
	Sbjct	3718	AAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCTTTGATCAGAGC	3777
	Query	360	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAGGTAC	419
	Sbjct	3778	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAGGTAC	3837
	Query	420	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAATG	479
	Sbjct	3838	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAATG	3897
	Query	480	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	539
	Sbjct	3898	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	3957
<hr/>				
B	Query	39	VRSFCKTCIVRYLETISKYCPICDVQVHKTRPLLNIRSDKTLQDIVYKLVPLFKNEMKRR	218
	Sbjct	35	LHSFCKTCIVRYLETISKYCPICDVQVHKTRPLLNIRSDKTLQDIVYKLVPLFKNEMKRR	94
	Query	219	RDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLDRkvnkekpke	398
	Sbjct	95	RDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLDRKVNKEKPKE	154
	Query	399	evndkRYLRCPAAMTMHLRKFRLSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYYTLMDIAYIYTWR	578
	Sbjct	155	EVNDKRYLRCPAAMTMHLRKFRLSKMDIPNTFQIDVMYEEEEPLKDYYTLMDIAYIYTWR	214
	Query	579	RNGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQ RDGLTNAGELES DSGSDKANS PAGGVPstssclpsps	758
	Sbjct	215	RNGPLPLKYRVRPTCKRMKMSHQ RDGLTNAGELES DSGSDKANS PAGGVPSTSSCLPSPS	274
	Query	759	tpVQSPHPQFPFPHISSTMNGTSNSPSANHQSSFASRLRKSSLNG 887	
	Sbjct	275	TPVQSPHPQFPFPHISSTMNGTSNSPSANHQSSFASR RKSSLNG 317	

Рисунок 18. А. - нуклеотидная последовательность участка гена *Bmi-1*, полученная в результате секвенирования по Сенгеру вектора CMV pL4 puro *Bmi-1* №1; Б – аминокислотная последовательность данного фрагмента.

№3 (Рис.18). 100% сходства с геном *Mus musculus Bmi1 polycomb ring finger oncogene (Bmi1), transcript variant X2*; представлен фрагмент нуклеотидной последовательности сиквенса (выше), сравненного с нуклеотидной последовательностью гена *Bmi1*, и ниже аминокислотная последовательность сиквенса и *polycomb complex protein BMI1 [Mus musculus]*. Замен в нуклеотидной последовательности не обнаружено.

A	Query	177	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTATGCAGCTCAC	236	
	Sbjct	3598	TTAGTCCCAGGGCTTTTCAAAAATGAGATGAAGAGAAGAAGAGATTTTATGCAGCTCAC	3657	
	Query	237	CCGTGAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	296	
	Sbjct	3658	CCGTGAGCTGATGCTGCCAATGGCTCCAATGAAGACCGAGGAGAAGTTGCAGATGAGGAG	3717	
	Query	297	AAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCCTTGATCAGAGC	356	
	Sbjct	3718	AAGAGGATTATAACTGATGATGAGATAATAAGCTTGTCTATTGAGTTCCTTGATCAGAGC	3777	
	Query	357	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTAC	416	
	Sbjct	3778	AGATTGGATCGGAAAGTAAATAAAGAGAAGCCTAAGGAAGAGGTGAATGATAAAAAGGTAC	3837	
	Query	417	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACCTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAATG	476	
	Sbjct	3838	TTACGATGCCCAGCAGCAATGACTGTGATGCACCTTGAGAAAGTTTCTCAGGAGTAAAATG	3897	
	Query	477	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	536	
	Sbjct	3898	GACATACCCAATACTTTCCAGATTGACGTCATGTATGAAGAGGAACCTTTAAAGGATTAC	3957	
	Query	537	TACACGCTAATGGACATTGCCTACATTTATACCTGGAGAAGAAATGGCCCACTACCTTTG	596	
	Sbjct	3958	TACACGCTAATGGACATTGCCTACATTTATACCTGGAGAAGAAATGGCCCACTACCTTTG	4017	
	Б	Query	189	LFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLDR	368
		Sbjct	96	LFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEEKRIITDDEIISLSIEFFDQSRLDR	155
Query		369	kvnkepkeevndkRYLRCPAAMTVMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEPLKDYITLM	548	
Sbjct		156	KVNKEKPKEEVNDKRYLRCPAAMTVMHLRKFLRSKMDIPNTFQIDVMYEEEPLKDYITLM	215	
Query		549	DIAYIYTWRNGLPLPKYRVRPTCKRMKMSHQ RDGLTNAGELES DSGSDKANS PAGGVps	728	
Sbjct		216	DIAYIYTWRNGLPLPKYRVRPTCKRMKMSHQ RDGLTNAGELES DSGSDKANS PAGGVPS	275	
Query	729	tssclpsspstpVQSPHPQFPHISSTMNGTSNPSANHQSSFASRPRKSSSLNGSSA	893		
Sbjct	276	TSSCLPSPSTPVQSPHPQFPHISSTMNGTSNPSANHQSSFASRPRKSSSLNGSSA	330		

Рисунок 19. А. - нуклеотидная последовательность участка гена *Bmi-1*, полученная в результате секвенирования по Сенгеру вектора CMV pL4 puro *Bmi-1* №1; Б – аминокислотная последовательность данного фрагмента.

№4 (Рис.19). 100% сходства с геном *Mus musculus Bmi1 polycomb ring finger oncogene (Bmi1), transcript variant X2*; представлен фрагмент нуклеотидной последовательности сиквенса (выше), сравненного с нуклеотидной последовательностью гена *Bmi1*, и ниже аминокислотная последовательность сиквенса и polycomb complex protein BMI1 [*Mus musculus*].
 Замен в нуклеотидной последовательности не обнаружено.

5 Обсуждение

5.1 Характеристика клеточных линий

5.1.1 Анализ изменений в экспрессии онкогенов

По данным гистограммы (Рис.9, А) *Ezh2* повышается в иммортализованных культурах клеток кроме иммортализованной культуры НаСаТ. *Ezh2* – белок регулятор метастазирования, лизинметилтрансфераза, входящий в состав комплекса PRC2, который способен ремоделировать хроматин. *Ezh2* подавляет транскрипцию множества генов, кодирующих факторы регуляторов контрольных точек пролиферации, из-за чего клетка изменяет свою способность к пролиферации (то есть делится чаще). В первичных соматических клетках он является молчащим геном, но в опухолевых активируется, вероятно, комплексом PRC1, в состав которого входит активный *Vmi-1*, поэтому следовало ожидать, что экспрессия *Ezh2* повышается именно в иммортализованных клетках вместе с активацией *Vmi-1*.

PTEN – это также белок-супрессор метастазирования, является ингибитором сериновых протеаз. В отличие от *Ezh2*, его экспрессия, наоборот, понижается в иммортализованных культурах во всех типах клеток. Вероятно, это связано с тем, что PTEN может контролировать механизмы снижения роста раковых клеток, стабилизируя внеклеточный матрикс (Rose et al., 2017). Иначе, если клетки уже способны делиться неограниченно и не имеют репрессорного влияния на это со стороны внеклеточного матрикса, то здесь, предположительно, отсутствует контроль PTEN.

Важным результатом является наличие сниженной экспрессии PTEN в культуре первичных фибробластов d2 (Рис.9, Б). d1 и d2 – это фибробласты больных буллезным эпидермолизом. Люди с этим врожденным генодерматозом часто страдают от плоскоклеточной карциномы кожи, что подразумевает под собой также некоторое нарушение структуры внеклеточного матрикса (Condorelli et al., 2019).

p63 – белок, специфичный для тех кератиноцитов эпидермиса, которые подобно другим стволовым клеткам организма, делясь неограниченно, пополняют запас клеток, идущих в более полную дифференцировку. *p63* является фактором транскрипции, показано что именно его молекулярная и клеточная роль важна в поддержании пролиферации и дифференцировки кератиноцитов (разные изоформы отвечают за регуляцию разных маркеров терминальной дифференцировки; Sandilands et al, 2009). Наши результаты показывают, что экспрессия *p63* повышается в иммортализованных культурах клеток (Рис.9, В); при данных соотношениях можно отчетливо увидеть, что наиболее велико его содержание в клетках HaCaT, что, возможно, говорит о высокой пролиферативной способности данной культуры. В итоге, более высокий уровень экспрессии *p63* обнаружен в более активно делящихся клетках, что соответствует факту, что *p63* отвечает за пролиферацию кератиноцитов.

hTERT – каталитическая субъединица теломеразы, прослеживается закономерность повышенной экспрессии гена в иммортализованных клетках (Рис.9, Г), что является логичным, так как именно благодаря *hTERT* происходит увеличение пролиферативного потенциала. Однако этот результат не был совсем очевиден, так как часто после активной работы теломеразы, в клетке включаются другие онкогены, и экспрессия *hTERT* может замалчиваться. Линия спонтанно иммортализованной культуры кератиноцитов d118T показала наиболее высокое значение экспрессии данного гена, то есть в данной культуре, вероятно, активна работа теломеразы и сильно повышен пролиферативный потенциал.

Данные показывают, что иммортализация проходит по-разному, даже у схожих линий клеток. При этом в иммортализованных фибробластах d2T не очень хорошо выражена экспрессия самого *hTERT*, то есть в них теломераза может быть уже не экспрессируется так активно, но зато могут включаются в работу другие онкогены.

5.1.2 Маркеры плюрипотентности (факторы Яманака для ИПСК)

Экспрессия гена *c-Myc* по полученным данным повышена у иммортализованных культур. Причем, в линии спонтанно иммортализованных кератиноцитов d118T оказалась наибольшая экспрессия данного гена (Рис.10, А). Белок, кодируемый этим геном, тоже является онкогеном, и часто может отдельно использоваться для иммортализации, повышая уровень пролиферации (Alkema et al., 1997).

Oct4 – по результатам RT PCR обнаружилось, что экспрессия этого гена повышена только в культуре иммортализованных клеток фибробластов d2. Данный белок участвует в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. Широко используется как маркер для недифференцированных клеток. Аналогичный результат выявлен для гена *Sox2*. Он регулирует самообновление, важен для поддержания стволовых клеток во многих взрослых тканях.

Экспрессия *NANOG* обнаружена преимущественно в d2 T FB и d118 T EK. Такие же результаты и в случае с *Klf4*. *NANOG* - транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток. *KLF4* участвует в регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза и перепрограммировании соматических клеток.

Задача *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *NANOG* - поддержание плюрипотентности. Активация этих четырех факторов достаточна для репрограммирования клеток, но мы не можем утверждать о переходе клеток в состояние ИПСК без анализа дополнительных генов, морфологии и иных факторов. Из полученных результатов мы видим, что экспрессия всех этих факторов присутствуют в клетках иммортализованных фибробластов d2T. *Oct4* - участвует в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток, и широко используется как маркер для недифференцированных клеток (Shi, Jin, 2010). *Sox2*, который показал аналогичный результат в d2T культуре, регулирует самообновление и также важен для поддержания стволовых клеток

во многих взрослых тканях (Novak et al., 2019). Вероятно, данная линия фибробластов имеет иной способ иммортализации и сниженный уровень дифференцировки в связи с тем, что тут присутствует экспрессия факторов плюрипотентности. Таким образом, в случае d2T мы имеем дело с клетками, начавшими дедифференцироваться в сторону ИПСК, но еще сохраняющими свой статус как фибробласты. Интересно проследить за судьбой данной культуры в дальнейшем ее культивировании.

В культуре иммортализованных кератиноцитов d118T, которые были иммортализованы совсем иным, спонтанным способом после введения вектора с геном *hTERT*, наличия Oct4 и Sox2 не наблюдается, но присутствуют Klf4 и NANOG. NANOG - транскрипционный фактор, участвующий в самообновлении недифференцированных эмбриональных стволовых клеток (Gong et al., 2015). Klf4 наравне с Oct4, Sox2 и c-Myc необходим для эпигенетического перепрограммирования соматического генома, важен для эпителиально-мезенхимальных переходов в эмбриогенезе, участвует в регуляции пролиферации и в дифференцировке (Tiwari et al., 2013). Известно, что сайт узнавания Klf4 присутствует в промоторе ферментативной субъединицы теломеразы (Tiwari et al., 2013), что, возможно, связывает способ активации иммортализации данных культур клеток и включение активации факторов плюрипотентности, что тоже может указывать на иной способ поддержания бессмертности культуры.

5.1.3 Гены, кодирующие маркерные белки фибробластов

FBRS (фибозин) – фиброгенный лимфокин, типичный маркер фибробластов, который активирует несколько процессов, связанных с регенерацией тканей, в том числе дермы. Он стимулирует эпителизацию ран и ускоряет заживление; участвует в формировании коллагенового матрикса, а также в ремоделировании внеклеточного матрикса *in vivo*. экспрессия представлена у первичных фибробластов, у иммортализованных заметно снижена (Рис.11, А). Мы видим, что при иммортализации фибробласты снизили

его экспрессию. Также видим снижению экспрессии *FBRS* в культуре d2. К сожалению, здесь и далее наш эксперимент лишен контроля в виде фибробластов от здорового донора, не больного БЭ, что было бы интересно посмотреть и сравнить, учитывая возможные нарушения внеклеточного матрикса дермы больных БЭ.

S100A4 – является важным белком для всех фибробластов, нужный для ремоделирования нормальных тканей; опосредует метастазирование, способствуя подвижности клеток и деградации внеклеточного матрикса (Tamaki et al., 2013). По полученным данным его уровень занижен в наших иммортализованных культурах.

Экспрессия *HMGB1* – типичный маркер фибробластов; экспрессия обнаружена в первичных фибробластах d1 и d2, а также наблюдается некоторое повышение его экспрессии в иммортализованных d1T, но снижение в иммортализованных d2T (Рис.11, Б). Экзогенный *HMGB1* может индуцировать пролиферацию человеческих дермальных фибробластов и может действовать как профиброгенная молекула для производства коллагена. *HMGB1* повышает уровень экспрессии коллагена I и III типов, эластина и фибронектина в дермальных культурах (Lee et al., 2018). Интересно отметить результат, что в культуре первичных клеток d1 примерно в 10 раз меньше экспрессия *HMGB1*, чем в культуре d2 – эти различия показывают отличия фибробластов у доноров с буллезным эпидермолизом, что может говорить о нарушении матрикса и структуры дермы в целом. Но мы не можем однозначно их трактовать без дополнительных исследований: следует провести анализ на более широкой группе доноров и с здоровыми донорами в сравнении.

Далее рассмотрим результаты генов, показывающие различия фибробластов слоев дермы. При культивировании первичных культур фибробласты в основном переходят к состоянию аналогичному ретикулярному слою. Папиллярный слой в культуре поддержать не удастся. *CD90* – экспрессируется преимущественно в фибробластах ретикулярного слоя

(Philippeos et al., 2018). По нашим данным он обнаруживается в культуре первичных фибробластов d1 (Рис.11, В). CD39 – маркер папиллярного слоя, экспрессия обнаружена в культуре immortalized фибробластов d1T (Рис.11, Г). По данным результатам можно предположить, что при immortalization начинает экспрессироваться маркер CD39, характерный для папиллярного слоя, а экспрессия CD90 наоборот, снижается. Возможно, это связано с тем, что immortalized культуры лучше поддерживают состояние фибробластов папиллярного слоя, либо экспрессия CD39 связана конкретно с активно делящимися фибробластами, такими как фибробласты папиллярного слоя (у ретикулярного слоя пролиферация сильно снижена) и immortalized клетки.

MGP – типичный маркер ретикулярных фибробластов; вероятно, он участвует в поддержании плотности ткани, так как ретикулярная дерма плотнее папиллярной (Barrett et al., 2018). Его экспрессия представлена в первичных фибробластах, но не в immortalized (Рис.11, Д). Вероятно, это может объясняться частичной потерей дифференцированных свойств immortalized клеток.

GM-CSF – критический сигнальный фактор, важный для регуляции кератиноцитов. По полученным данным его экспрессия наблюдается только в d1 фибробластах (Рис.11, Ж). В культуре и папиллярные, и ретикулярные фибробласты синтезируют GM-CSF, хотя папиллярные обычно показывают его более высокую экспрессию (Ripra et al, 2019). При immortalization (в обоих случаях) его экспрессия заметно снижается.

Таким образом, обобщая полученные результаты по маркерам фибробластов, можно заметить, что в immortalized культурах, особенно в культуре Fb d2T, происходит снижение экспрессии всех характерных маркеров, что свидетельствует о снижении дифференцировки клеток, но таковая все равно присутствует, так как экспрессия все равно происходит. Первичные культуры показывают черты ретикулярных фиброцитов, в то время

как иммортализованные культуры навряд ли могут являться папиллярным слоем из-за отсутствия экспрессии *GM-CSF*, и не являются ретикулярным слоем из-за повышенной пролиферации и из-за отсутствия белка CD-90 и MGP.

5.1.4 Гены, кодирующие маркеры кератиноцитов

Важный результат получен в результате анализа данных экспрессии генов для иммортализованных культур кератиноцитов HaCaT, d2TB и d118T (Рис.12, А, Б, В): мы видим присутствие экспрессии *Flg*, *Inv* и *Lor*, что является важной частью дифференцировочного паттерна кератиноцитов.

Низкая экспрессия *Col7a1* наблюдается в первичных клетках больных, как в кератиноцитах (d1, d2), так и в фибробластах (d2Fb; Рис.12, Г). Доноры данных клеточных культур являются носителями наследственного дистрофического БЭ, при котором происходит нарушение в белке коллагена VII. Коллаген VII образуется кератиноцитами и фибробластами, локализуется под базальной мембраной, где он входит в состав фибрилл, необходимых для прочного крепления эпидермиса к дерме (March, Reichelt, 2018). В коже больных количество таких фибрилл снижено или они морфологически неполноценны. Предполагалось, что экспрессия данного гена не должна сильно изменяться, если причина возникновения болезни заключается только лишь в нарушении структуры белка. В данном случае мы наблюдаем низкое содержание мРНК *Col7a1* в клетках. Это может быть связано с низкой транскрипцией этого гена, что может объясняться, например, мутацией в сайтах регуляции гена, или, что вероятнее, это может быть связано с неправильным прохождением сплайсинга.

Параллельно с данной работой в нашей лаборатории проводились исследования по подтверждениям мутаций в гене *Col7a1* у различных доноров, в том числе у доноров d1 и d2. В результате оказалось, что у донора d1 имеется гомозиготная мутация в экзоне 3, у донора d2 – гетерозиготная мутация, которая присутствует в интроне 5. Обе эти мутации приводят, в том числе, к нарушению сплайсинга, что может приводить в случае активации

деградационных механизмов к уменьшению количества мРНК в клетке (по работе студента лаборатории Корчивой Е.С.)

Также сниженная экспрессия *Col7a1* заметна у здорового донора d65, но это, вероятно, связано с возрастом данного донора: на более поздних этапах постнатального развития эпидермальные структуры реже обновляются, и, как следствие, реже происходит синтез новых составляющих фибрилл.

Экспрессия *Krt1* – основного структурного элемента шиповатого слоя – наблюдается во всех анализируемых иммортализованных культурах кератиноцитов (Рис.12, Д). Кератин 1 является доминантными цитоскелетными филаментами при переходе от пролиферативной стадии к терминальной стадии дифференцировки, поэтому его экспрессия подтверждает наличия паттерна терминальной дифференцировки кератиноцитов (Kartasova et al, 2009).

K16 (*Krt16*) – из трех представленных иммортализованных культуры наиболее высокая экспрессия наблюдается в культуре иммортализованных кератиноцитов d2ТВ (Рис.12, Е). Это кератин, который преимущественно синтезируется во время регенеративных процессов (Bragulla, Homberger, 2009). d2 – это кератиноциты больного БЭ, поскольку кожа больных испытывает постоянные раунды регенерации в попытке организма к заживлению ран. Вероятно, дифференцировка культуры d2ТВ проходит аналогично эпидермису при заживлении ран.

Трансглутаминазы – ферменты, которые участвуют в сшивании белков в кератиноцитах и в формировании ороговевшей клеточной оболочки терминально дифференцированного эпидермиса. Данные по экспрессии трансглутаминаз, хотя они предварительные и нуждаются в контролях, показывают, что мРНК *TGM1* присутствует во всех рассматриваемых культурах клеток. Экспрессия *TGM3* сильно снижена по сравнению с остальными образцами в культурах HaCaT и d118T (Рис.12, Ж, И). Известно, что при конструировании эквивалентов кожи из клеток HaCaT они не проходят ороговевания. По литературным данным *TGM3* экспрессируется на более

поздних стадиях кератинизации, возможно, из этого можно сделать вывод, что в культурах HaCaT и d118T не происходит полная дифференцировка кератиноцитов (Liedén et al., 2012). По данным, полученным в нашей лаборатории аспирантом Аркадием Бейлиным, при культивировании искусственного эквивалента кожи с клетками d118T также не происходило ороговевания (Рис.20).

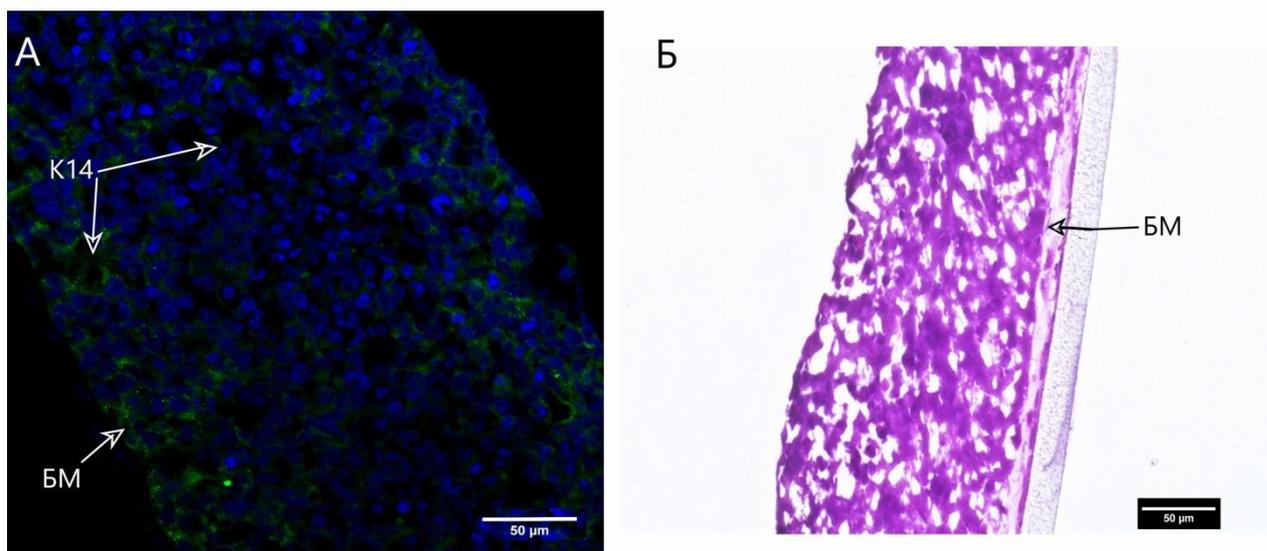


Рисунок 20. Искусственно культивированный эквивалент кожи с клетками иммортализованных культур кератиноцитов и фибробластов d118: **А.** – ИГХ окрашивание K14 в срезе (Alexa (зеленый) и окраска ядер DAPI (синий), флуоресцентное конфокальное микрофотографирование). Мы наблюдаем K14 практически во всех образованных слоях. Учитывая, что K14 характерен для митотически активных клеток, а особенно для базального слоя, и его экспрессия уменьшается при дифференцировке; то в данном случае клетки слоев кожи остаются на ранних стадиях кератинизации. **Б.** – срез эквивалента, окрашенный гематоксилином и эозином (световая микроскопия, x40) На обеих фотографиях можно заметить очень незначительное уплощение кератиноцитов, находящихся с противоположной стороны от БМ, что может свидетельствовать о сниженной дифференцировке кератиноцитов и о практически полном отсутствии наличия рогового слоя. БМ – базальная мембрана, K14 – кератин 14. Фотографии предоставлены Аркадием Бейлиным.

Уровень мРНК гена *Krt5* по данным гистограмм снижен у больных d1 и наиболее высок в культуре кератиноцитов здорового донора d65, но в целом во всех культурах наблюдается экспрессия данного гена. Интересно рассмотреть результаты, полученные для первичных культур фибробластов: у здорового донора d118 наблюдается полное отсутствие мРНК *Krt5*, что и положено для нормальных дермальных фибробластов, но у донора d2 наблюдается

существенное повышение экспрессии этого гена. Известны работы, где подтверждается возникновение синтеза кератина 5 в фибробластах при ЭМП в эмбриогенезе, а также при возникновении опухолей кожи (Dadhania et al., 2016; Jangir et al., 2019). У больных, страдающих БЭ, часто возникает плоскоклеточная карцинома, что, возможно, и является причиной повышения экспрессии *Krt5*.

5.2 Иммуногистохимическое окрашивание

5.2.1 Анализ распределения *Vmi-1* и *hTERT* иммортализованных культур клеток

Экспрессию генов иммортализации можно изучить с помощью другого метода – метода иммуногистохимического окрашивания, используя антитела против белков, ими кодируемых. Нами были рассмотрены белки *Vmi-1* и *hTERT* и в результате были получены фотографии на конфокальном микроскопе иммортализованных культур клеток (Рис.13). Окраска обоих белков прошла у всех трех рассматриваемых культур ЕК d1, d2 и Fb d2: видна колокализация *Vmi-1* и *hTERT*, которые находятся в ядре, точки наибольшей концентрации, а также наблюдается небольшое присутствие *hTERT* и в цитоплазме фибробластов d2 (Рис.13, Г). При этом в кератиноцитах d2 не очень хорошо выражена экспрессия *hTERT* в сравнении с ЕК d1 и Fb d2, зато, вероятно, включаются в работу другие онкогены, что также показывают данные, полученные с помощью RT PCR (высокий уровень экспрессии генов плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *NANOG*). Эти данные показывают, что иммортализация проходит по-разному, даже у схожих линий клеток.

Несмотря на заметно сниженную экспрессию генов, кодирующих маркеры фибробластов в культуре Fb d2 (d2T), на фотографии мы видим типичную фибробластоподобную морфологию клеток, что говорит нам о том, что выявленный уровень экспрессии этих генов достаточен для поддержания морфологии фибробластов.

5.2.2 Анализ распределения экспрессии структурных белков в образцах кожи от здорового донора и больных ВБЭ с неизвестной мутацией.

Отличия в синтезе маркерных белков в первичных культурах клеток у здоровых доноров кожи и больных буллезным эпидермолизом также возможно определить с помощью метода иммуногистохимии. Этот метод часто используется для диагностики генодерматозов с окрашиванием специфических белков кератиноцитов и фибробластов криосрезов биоптата кожи. Это дает некоторую основу для дальнейшего поиска конкретной мутации. В данном случае мы провели окрашивание K5, K14 и плектина у двух больных БЭ доноров, и визуально сравнили полученные данные с флюоресцентными фотографиями срезов здоровой кожи.

С помощью данного метода мы можем проследить локализацию данных белков и проследить, где происходит их наибольшая экспрессия (Рис.14). Так, кератин 14 окружает клетки эпидермиса в базальном и шиповатом слоях, также присутствует в толще самих клеток; в более вышележащих слоях интенсивность флюоресцентной окраски градиентно уменьшается и практически полностью отсутствует в роговом слое. Визуальная оценка паттерна экспрессии Krt5 в контроле показывает его равномерное расположение преимущественно в нижних слоях эпидермиса: очень интенсивное свечение в нижних слоях эпидермиса (базальный слой) с его уменьшением в вышележащих слоях. Таким образом, можно подтвердить тот факт, что данные кератины синтезируются на более ранних этапах дифференцировки кератиноцитов, включая наиболее активно делящиеся клетки.

Мы наблюдаем неравномерную экспрессию Krt14 в краевой цитоплазме клеток эпидермиса донора d11, а также возникновение агрегатов белка. Однако сделать на основании этого наблюдения какие-либо выводы мы не можем. Такое проявление наблюдается только у данного донора: окрашивание срезов d5a выглядит схоже с контролем. Для кератина 5 не замечена разница в

паттерне экспрессии в коже у больных доноров d5a и d11 по сравнению со здоровым контролем.

Окрашивание кожи антителами против плектина показало его локализацию в районе базальной мемbrane (наиболее ярко-окрашенная полоса на границе эпидермиса и дермы) и некоторое свечение вокруг клеток эпидермиса. Плектин входит в состав гемидесмосом и десмосом (Laimer, Bauer, 2015), поэтому его присутствие, вероятно, указывает нам на наличие данных межклеточных контактов. Полудесмосомы расположены на нижнем полюсе базальных кератиноцитов. У доноров d5a и d11 мы наблюдаем сниженный уровень экспрессии плектина и присутствие прерывистых линий по сравнению со здоровым донором.

Цитокератины 5 и 14 входят в состав промежуточных филаментов, непосредственно связанных с плектином полудесмосом. На основании выявленного нарушения экспрессии плектина и коллагена 14 у d11 можно предположительно диагностировать простой тип БЭ у пациента d11. Диагноз d5a требует дополнительное исследование на ИГХ окрашивание коллагена VII, а также оба образца требуют подтверждения мутаций с помощью секвенирования.

5.3 Получение вектора P14 CMV puro *Vmi-1*

Анализируемые с помощью RT PCR иммортализованные культуры кератиноцитов и фибробластов были ранее получены с помощью трансдукции лентивирусами, содержащими кДНК hTERT и кДНК гена *Vmi-1*. hTERT была разработана и собрана в нашей лаборатории, она несет ген устойчивости к пурамицину.

Несмотря на то, что конструкция с *Vmi-1* была получена в нашей лаборатории, она не содержала гена устойчивости к антибиотикам, поэтому в мою задачу входило получить плазмиду, содержащую *Vmi-1* одновременно с геном устойчивости.

В результате удалось получить плазмиду CMV P14 puго *Vmi-1* с геном устойчивости к пурамицину. Полученные вектора были секвенированы с целью подтверждения правильности моего клонирования.

В результате секвенирования по Сэнгеру четырех плазмид, показавших положительный результат после скрининга на наличие кДНК *Vmi-1*, в двух последовательностях векторов обнаружилась нуклеотидная замена, которая привела к аминокислотной замене (треанин на аланин в 396 положении аминокислоты гена *Vmi-1* плазмиды №1 и пролин на гистидин в 844 положении плазмиды №2). А вот в двух других векторах №3,4 никаких мутаций обнаружено не было, что значит, что эти плазмиды могут быть использованы для трансфекции кератиноцитов.

6 Выводы

1. Проведена характеристика первичных и иммортализованных культур клеток эпидермальных кератиноцитов и фибробластов кожи от здоровых доноров и доноров, болеющих НБЭ, с помощью исследования экспрессии генов, кодирующих маркерные белки, методом RT PCR и с помощью иммуногистохимического окрашивания данных белков;

2. Показано, что в различных культурах клеток иммортализация проходит по-разному благодаря экспрессии различных генов, контролирующей активность hTERT;

3. Был получен вектор CMV pL4 puго *Vmi-1*, несущий ген устойчивости к антибиотику, который можно использовать для трансфекции клеток и получения иммортализованных культур.

7 Список литературы

1. Быков В. Л. Частная гистология человека. — Санкт-Петербург: СОТИС, 2011. — 304 с.
2. Гуляй П. Д. Кожные и венерические болезни: Учебное пособие. Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2003. - 182 с.
3. Зайцева Н.С. Механизмы влияния гиперосмотических растворов препарата «Рапан» на процессы пролиферации и дифференцирования кератиноцитов *in vivo*: дис.-канд. биол. Наук.Новосибирск., 2014. - 122 с.
4. Корнеева Л.С., Мельниченко Н.Е. Генодерматозы: Учебное пособие. 2014, Благовещенск: ГБОУ ВПО Амурская ГМА Минздрава России. 47 с.
5. Соболева А. Г., Золотаренко А. Д., Соболев В. В., Брускин С. А. и другие. Генетически обусловленное ограничение использования клеток HaCaT в качестве модельной системы псориаза // Генетика, 2014. Т.50. С.1222–1231.
6. Хлебникова А. Н., Петрунин Д. Д., Молочков А. В., Липиды человеческого эпидермиса (фундаментальные сведения и клиническая имплементация): Учебное пособие – М: МОНИКИ, 2015. – 76 с.
7. Ahuja D., Sáenz-Robles M. T., Pipas J. M. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation // Oncogene. Nature Publishing Group, 2005. V. 24. P. 7729-7745.
8. Alajez N. M., Shi W., Hui A. B. Y. et al. Targeted depletion of BMI1 sensitizes tumor cells to P53-mediated apoptosis in response to radiation therapy // Cell Death and Differentiation, 2009. V.16. P. 1469–1479.
9. Alam H., Sehgal L., Kundu S. T., Dalal S. N., Vaidya M. M. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells // Molecular Biology of the Cell, 2011. V. 22. P. 4068–4078.
10. Alkema M. J., Jacobs H., Lohuizen, M. Van, Berns A. Perturbation of B and T cell development and predisposition to lymphomagenesis in E m Bmi 1 transgenic mice require the Bmi1 RING finger // Oncogene, 1997. V. 15. P. 899-910.

11. Alkemade J. A. C., Molhuizen H. O. F., Ponc M., et al. SKALP/elafin is an inducible proteinase inhibitor in human epidermal keratinocytes // *Journal of Cell Science*, 1994. V. 107. P. 2335–2342.
12. Alvarez J. V., Frank D. A. Genome-wide analysis of STAT target genes: Elucidating the mechanism of STAT-mediated oncogenesis // *Cancer Biology and Therapy*, 2004. V. 3. P. 1045–1050.
13. Amsterdam A., Keren-Tal I., Aharoni, D. Cross-talk between cAMP and p53-generated signals in induction of differentiation and apoptosis in steroidogenic granulosa cells. *Steroids // Human Reproduction Update*, 1996. V. 61. P. 252–256.
14. Babu N. A., Rajesh E., Krupaa J., Gnananandar G. Genodermatoses // *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. Medknow Publications, 2015. V.7. P. 203-206.
15. Barker J. N. W. N., Griffiths C. E. M., Nickoloff B. J., Mitra et al. Keratinocytes as initiators of inflammation // *The Lancet*, 1991. V. 337. P. 211–214.
16. Barrandon Y., Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication// *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1987. V. 84. P.2302–2306.
17. Barrett H., O’Keeffe M., Kavanagh E., Walsh M., O’Connor E. M. Is matrix Gla protein associated with vascular calcification? A systematic review // *Nutrients*, 2018. V. 10. - 18 p.
18. Beaver C. M., Ahmed A., Masters, J. R. Clonogenicity: Holoclones and meroclones contain stem cells // *PLoS ONE*, V.9. - 13 p.
19. Boukamp P., Petrussevska R. T., Breitkreutz D. et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line // *Journal of Cell Biology*, 1988. V.106. P. 761–771.
20. Bragulla H. H., Homberger D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia // *In Journal of Anatomy*, 2009. V. 214. P. 516–559.
21. Brettmann E. A., de Guzman Strong C. Recent evolution of the human skin barrier // *Experimental Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd, 2018. V.27. P. 859-866.

22. Cai Q., Niu H., Zhang B., Shi X. et al. Effect of EZH2 knockdown on preimplantation development of porcine parthenogenetic embryos // *Theriogenology*, 2019. V.132. P.95–105.
23. Catunda R., Rekhi U., Clark D., Levin L., Febbrai, M. Loricrin downregulation and epithelial-related disorders: a systematic review // *JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2019. V. 17. P. 1227–1238.
24. Čepelak I., Dodig S., Pavić I. Filaggrin and atopic march // *Biochemia Medica*, 2019. V.29. P. 214-227.
25. Claudinot S., Nicolas M., Oshima, H., Rochat A., Barrandon Y. Long-term renewal of hair follicles from clonogenic multipotent stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. V.102. P. 14677–14682.
26. Condorelli A. G., Dellambra E., Logli E., Zambruno G., Castiglia D. Epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinoma: From pathogenesis to therapeutic perspectives // *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. V.20. - 28 p.
27. Dadhania V., Zhang M., Zhang L., Bondaruk J., Majewski T. et al. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use // *EBioMedicine*, 2016. V.12. P.105–117.
28. Dakic A., DiVito K., Fang S., Supryniewicz F., et al. ROCK inhibitor reduces Myc-induced apoptosis and mediates immortalization of human keratinocytes // *Oncotarget*, 2016. V.7. P. 66740–66753.
29. De Felici M., Klinger F. G. Programmed cell death in mouse primordial germ cells // *The International Journal of Developmental Biology*, 2015. V.59. P. 41–49.
30. Dickson M. A., Hahn W. C., Ino Y., Ronfard V., Wu, J. Y. et al. Human Keratinocytes That Express hTERT and Also Bypass a p16INK4a-Enforced Mechanism That Limits Life Span Become Immortal yet Retain Normal Growth and Differentiation Characteristics // *Molecular and Cellular Biology*, 2000. V.20. P.1436–1447.

31. Dimri G. P., Martinez J. L., Jacobs J. J. L., Keblusek P. et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells // *Cancer Research*, 2002. V.62. P.4736–4745.
32. Driskell R. R., Watt F. M. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin // *Trends in Cell Biology*, 2015. V.25. P.92–99.
33. Eckert R. L., Efimova T., Dashti S. R., Balasubramanian S., Deucher A. et al. Keratinocyte survival, differentiation, and death: Many roads lead to mitogen-activated protein kinase // In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2002. V.7. P.36–40.
34. Eva R., Bram D. C., Joery D. K., Tamara V., Geert B. Europe PMC Funders Group Strategies for immortalization of primary hepatocytes // *Europe PMC Funder Group*, 2014. V.61. P.925–943.
35. Fessing M. Y., Mardaryev A. N., Gdula M. R., Sharov A. A. P63 regulates Satb1 to control tissue-specific chromatin remodeling during development of the epidermis // *Journal of Cell Biology*, 2011. V. 194. P. 825–839.
36. Fine J-D, Eady R.A.J, Bauer J.A., et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB // *J Am Acad Dermatol*, 2008. V.58. P.931–950.
37. Fine J.D., Bauer E.A., McGuire J., Moshell A. Epidermolysis bullosa: clinical, epidemiologic, and laboratory advances, and the findings of the National Epidermolysis Bullosa Registry // *Pediatric Dermatology*, 2000. V.17. P.502.
38. Frank D. A. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation // *Cancer Letters*, 2007. V.251. P.199–210.
39. Gan L., Yang Y., Li, Q., Feng Y., Liu T., Guo W. Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential // *Biomarker Research*, 2018. V.6. P.1–10.
40. Gil J., Kerai P., Lleonart M., Bernard D., Cigudosa J. C. et al. Immortalization of primary human prostate epithelial cells by c-Myc // *Cancer Research*, 2005. V.65. P.2179–2185.
41. Gong S., Li Q., Jeter C. R., Fan Q., Tang D. G., Liu B. Regulation of NANOG

in cancer cells // *Molecular Carcinogenesis*, 2015. V. 54. P.679–687.

42. Gurzu S. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: An update // *World Journal of Clinical Cases*, 2015. V.3. P.393.

43. Hiiragi T., Sasaki H., Nagafuchi A., Sabe H., Shen S. C. et al. Transglutaminase type 1 and its cross-linking activity are concentrated at adherens junctions in simple epithelial cells // *Journal of Biological Chemistry*, 1999. V.274. P. 34148–34254.

44. Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., Anton R., Hierholzer A., Del Valle I. et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells // *Science*, 2012. V.336. P.1549–1554.

45. Hur K., Toiyama Y., Takahashi M., Balaguer F., Nagasaka T. et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis // *Gut*, 2013. V.62. P.1315–1326.

46. Hussein M. R. Apoptosis in the ovary: Molecular mechanisms .. *Human Reproduction Update*, 2005. V.11. P.161–177.

47. Huth S. et al. Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITIH5) is overexpressed in inflammatory skin diseases and affects epidermal morphology in constitutive knockout mice and murine 3D skin models // *Experimental Dermatology*, 2015. V.24. P.663-668.

48. Huvneers S., Danen E. H. J. Adhesion signaling - Crosstalk between integrins, Src and Rho // *Cell Science*, 2009. V.8. P.1059-1069.

49. Ishida-Yamamoto A., Igawa S., Kishibe M. Molecular basis of the skin barrier structures revealed by electron microscopy // *Experimenta Dermatology*, 2018. V.8. P. 841-846.

50. Jacobs J. J. L., Kieboom K., Marino S., DePinho R. A., and van Lohuizen, M. The oncogene and Polycomb-group gene Bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus // *Nature*, 1999. V.397. P.164–168.

51. Jacobs J. J. L., Scheijen B., Voncken J-W., Kieboom K., Berns A., and van Lohuizen, M. Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF // *Genes Dev.*, 1999. V.13. P.2678–2690.
52. Jangir H., Nambirajan A., Seth A., Sahoo R. K., Dinda A. K., Nayak B., Kaushal S. Prognostic stratification of muscle invasive urothelial carcinomas using limited immunohistochemical panel of Gata3 and cytokeratins 5/6, 14 and 20 // *Annals of Diagnostic Pathology*, 2019. V.43. P. 151397.
53. Johansen, C. Generation and culturing of primary human keratinocytes from adult skin // *Journal of Visualized Experiments*, 2017. V.130. P.1–5.
54. Kartasova T., Roop R., Yuspa, S. H. Mouse Differentiation-specific Keratins 1 and 10 Require a Preexisting Keratin Scaffold to Form a Filament Network // *The Journal of Cell Biology*, 1993. V.120. P.1251-1261.
55. Khan I., Steeg P. S. Metastasis suppressors: Functional pathways // *Laboratory Investigation*, 2018. V.98. P.198-210.
56. Kim E., Kim M., Woo D. H., Shin Y., Shin J. et al. Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells // *Cancer Cell*, 2013. V.2. P.839–852.
57. Koster M. I., Roop D. R. The role of p63 in development and differentiation of the epidermis // *Journal of Dermatological Science*, 2004. V.34. P.3-9.
58. Lanzuolo C., Orlando V. Memories from the Polycomb Group Proteins // *Annual Review of Genetics*, 2012. V.46. P.561–589.
59. Liu W. L., Guo X. Z., Zhang L. J., Wang J. Y., Zhang G. et al. Prognostic relevance of Bmi-1 expression and autoantibodies in esophageal squamous cell carcinoma // *BMC Cancer*, 2010. V.10. P.1–12.
60. Liu X., Disbrow G. L., Yuan H., Tomaic V., Schlegel R. Myc and Human Papillomavirus Type 16 E7 Genes Cooperate To immortalize Human Keratinocytes // *Journal of Virology*, 2007. V.81. P.12689–12695.
61. March O. P., Reichelt J. Gene editing for skin diseases : designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders // *Experimental Physiology*, 2018. V.4. P.449–455.

62. Martinet N., Kim H. C., Girardn J. E., Nigrall T. P. et al. Epidermal and Hair Follicle Transglutaminases // *The Journal of Biological Chemistry*, 1988. V.263. P. 4236–4241.
63. Merad M., Ginhoux F., Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells // *Nature Reviews Immunology*, 2008. V.8. P.935-947.
64. Natsuga K., Nishie W., Akiyama M., Nakamura H. et al. Plectin expression patterns determine two distinct subtypes of epidermolysis bullosa simplex // *Human Mutation*, 2010. V. 31. P. 1-9.
65. Nakamura T. M., Morin G. B., Chapman K. B., Weinrich S. L. et al. Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human // *American Association for the Advancement of Scien*, 2017. V.277. P.955–959.
66. Nithya S., Radhika T., Jeddy N. Loricrin - An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* // *Medknow Publications*, 2015. V.19. P.64-68.
67. Novak D., Hüser L., Elton J. J., Umansky V., Altevogt P., Utikal J. SOX2 in development and cancer biology // *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press, 2019.
68. Pei D., Shu X., Gassama-Diagne A., Thiery J. P. Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming // *Nature Cell Biology*, 2019. v.21. P.44–53.
69. Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza et al. p63 identifies keratinocyte stem cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. V.98. P.3156–3161.
70. Philippeos C., Telerman S. B., Oulès B., Pisco A. O. et al. Spatial and Single-Cell Transcriptional Profiling Identifies Functionally Distinct Human Dermal Fibroblast Subpopulations // *Journal of Investigative Dermatology*, 2018. V.138. P.811–825.
71. Pirrotta V. Polycomb the genome: PcG, trxG and chromatin silencing // *Cell*. Cell Press, 1998. V.93. P.333-336.
72. Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M. The skin: An indispensable barrier //

Experimental Dermatology, 2008. V.17. P.1063–1072.

73. Rinne T., Brunner H. G., Van Bokhoven H. p63-associated disorders // Cell Cycle, 2007. V.6. P.262-268.

74. Rippa A. L., Kalabusheva E. P., Vorotelyak E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved // Cells, 2019. V.8. P. 607-637.

75. Rose M., Kloten V., Noetzel E., Gola L. et al. ITIH5 mediates epigenetic reprogramming of breast cancer cells // Molecular Cancer, 2017. V.16. - 22 p.

76. Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., Meerson M. et al. Protein encoded in human telomerase RNA is involved in cell protective pathways // Nucleic Acids Research by Oxford University Pres, 2018. V.46. P.8966–8977.

77. Sandilands A., Sutherland C., Irvine A. D., McLean W. H. I. Filaggrin in the frontline: Role in skin barrier function and disease // Journal of Cell Science, 2009. V.122. P.1285–1294.

78. Sasaki K., Kurahara H., Young E. D., Natsugoe S. et al. Genome-wide in vivo RNAi screen identifies ITIH5 as a metastasis suppressor in pancreatic cancer // Clinical and Experimental Metastasis, 2017. V.34. P. 229–239.

79. Sayama K., Hanakawa Y., Shirakata Y., Yamasaki K. et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation // Journal of Biological Chemistry, 2001. V.276. P. 999–1004.

80. Schoop V. M., Mirancea N., Fusenig N. E. Epidermal organization and differentiation of HaCat keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts // Journal of Investigative Dermatology, 1999. V.112. P.343–353.

81. Schütze D. M., Krijgsman O., Snijders P. J. F., Ylstra B. et al. Immortalization capacity of HPV types is inversely related to chromosomal instability // Oncotarget, 2016. V.7. P.37608–37621.

82. Schweizer J., Bowden P. E., Coulombe P. A., Langbein L., Lane E. B. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. Journal of Cell Biology // The Rockefeller University Press, 2017. V.174. P.169-174.

83. Sedivy J. M. Can ends justify the means?: Telomeres and the mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells // Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. V.95. P. 9078-9081.

84. Seltmann K., Roth, W., Kröger C., Loschke F. et al. Keratins mediate localization of hemidesmosomes and repress cell motility. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013. V.133. P.181–190.

85. Shi G., Jin, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency // *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central, 2010. V.1. P.39-48.

86. Shimada K., Ochiai T., Hasegawa H. Ectopic transglutaminase 1 and 3 expression accelerating keratinization in oral lichen planus // *Journal of International Medical Research*, 2018. V.46. P.4722–4730.

87. Smith J. L., Lee L. C., Read A., Li Q., Yu B. et al. One-step immortalization of primary human airway epithelial cells capable of oncogenic transformation // *Cell and Bioscience*, 2018. V.6. P.39-47.

88. Smits J. P. H., Niehues H., Rikken G., Vlijmen-willems I. M. et al. Immortalized N / TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models // *Scientific reports*, 2017. V.7. P.1–14.

89. Soares E., Zhou H. Master regulatory role of p63 in epidermal development and disease // *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018. V.75. P.1179-1190.

90. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors // *Cell*, 2006. V.126. P.663–676.

91. Tamaki Y., Iwanaga Y., Niizuma S., Kawashima T. et al. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2013. V.57. P.72–81.

92. Tiwari N., Meyer-Schaller N., Arnold P., Antoniadis H., Pachkov M. et al. Klf4 Is a Transcriptional Regulator of Genes Critical for EMT, Including Jnk1 (Mapk8) // *PLoS ONE*, 2006. V.8. - 17 p.

93. Truong A. B., Kretz M., Ridky T. W., Kimmel R., Khavari P. A. p63 regulates

proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes // *Genes and Development*, 2016. V.20. P.3185–3197.

94. Vidal M., Starowicz K. Polycomb complexes PRC1 and their function in hematopoiesis // *Experimental Hematology*, 2017. V.8.

95. Waseem A, Dogan B, Tidman N, et al. Keratin 15 expression in stratified epithelia: Downregulation in activated keratinocytes // *J Invest Dermatol*, 1999. V.112. P. 362–369.

96. Watt F., Phil D. Involucrin // *The Journal of Investigative Dermatology*, 1983. V.81. P.100-103.

97. Wynford-Thomas D. Cellular senescence and cancer // *Journal of Pathology*, 1999. V.187. P.100–111.

98. Yamagishi M., Uchimaru K. Targeting EZH2 in cancer therapy // *Current Opinion in Oncology*, 2017. V.29. P.375–381.

99. Zhang J., Zhi H. Y., Ding F., Luo A. P., Liu Z. H. Transglutaminase 3 expression in C57BL/6J mouse embryo epidermis and the correlation with its differentiation // *Cell Research*, 2005. V.15. P.105–110.

100. Zhao S., Wang F., Liu L. Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) in Tumors and Pluripotent Stem Cells // *Genes*, 2019. V.10. P.1030-1043.

101. Zhu D. D., Zhang J., Deng W., Yip Y. L. et al. Significance of NF- κ B activation in immortalization of nasopharyngeal epithelial cells // *International Journal of Cancer*, 2014. V.138. P.1175–1185.