

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ БЕЛКОВ КЛЕТОЧНОЙ ПОДВИЖНОСТИ В ОТВЕТ НА ЭКСПОЗИЦИЮ UVA КЕРАТИНОЦИТОВ HaCaT

Ю.С. Кисриева*, Н.Ф. Саменкова, Н.А. Болоченков, А.Л. Русанов, Д.Д. Ромашин,
Н.А. Соловьева, И.И. Карузина, А.В. Лисица, Н.А. Петушкова

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10; *эл. почта: juliaks@bk.ru

Проведён сравнительный анализ белков кератиноцитов HaCaT в ответ на воздействие субтоксических доз (5 Дж/см² и 25 Дж/см²) ультрафиолетового излучения типа А (UVA). По двум и более уникальным пептидам было идентифицировано 930 белков. На долю белков, относительное содержание которых увеличивалось в кератиноцитах HaCaT в ответ на облучение кумулятивной дозой 5 Дж/см² не менее, чем в 2 раза, пришлось более половины (54,5%) всех идентифицированных белков. Снижение относительного содержания отмечено всего для 4 белков. Облучение кератиноцитов кумулятивной дозой 25 Дж/см² привело к снижению доли белков (43,0%) с повышенным уровнем регуляции и увеличению количества белков (84) с пониженным уровнем регуляции. Среди белков, относительное содержание которых в кератиноцитах HaCaT увеличивалось наиболее сильно, были белки, ассоциированные с процессом “клеточной подвижности” (GO: 0048870 — Cell motility), вовлечённые в процесс регуляции формы и размеров клеток, морфогенеза клеток и ремоделирования кожи.

Ключевые слова: кератиноциты HaCaT; UVA; 1DE-гель концентрирование; LC-MS/MS; MaxQuant; белки клеточной подвижности

DOI: 10.18097/PBMCR1482

ВВЕДЕНИЕ

Клетки линии HaCaT кератиноцитов человека — это спонтанно иммортализованные *in vitro* кератиноциты из гистологически нормального эпителия человека. Они способны неограниченно делиться, что определяет целесообразность их использования в качестве клеточной модели эпидермиса *in vitro* для исследования цитотоксичности [1]. Кератиноциты — основные клетки эпидермиса кожи человека. Они образуют защитный барьер против повреждений кожи, таких как механические травмы, термические поражения, химические воздействия и ультрафиолетовое (UV) излучение. UV излучение — один из основных инициаторов клеточного стресса, вызывающий ответные реакции, такие как индукция воспаления и дисрегуляция клеточного цикла [2]. Ультрафиолетовый спектр делится на три составляющие: UVA (320–400 нм), UVB (280–320 нм) и UVC (200–280 нм). UVC чрезвычайно вредно для кожи, но полностью поглощается озоновым слоем стратосферы и не достигает земли. Наиболее широким спектром негативных эффектов обладает UVB — основная длина волны, вызывающая рак кожи. UVA (95% от UV излучения достигает поверхности земли) менее вреден, но связан со старением кожи, в частности с изменением белков и эластичностью дермы [2]. Индуцируемое UVA развитие окислительного стресса в коже стимулирует специфические защитные механизмы, такие как утолщение рогового слоя эпидермиса, пигментацию,

перестройку кератиноцитов за счёт интенсификации внутриклеточной регенерации [3]. В дерматологической практике используют ультрафиолетовую терапию дальнего длинноволнового диапазона (длина волны 320–400 нм, UVA). Дозиметрия UVA подразделяется на режимы с низкой (≤ 40 Дж/см²), средней (40–80 Дж/см²) и высокой (80–130 Дж/см²) дозой [4]. Ультрафиолетовая терапия показала хорошие результаты при лечении атопического дерматита и склеротических заболеваний кожи [5].

В последние годы широко изучаются механизмы, вовлечённые в повреждение клеток кожи, в том числе кератиноцитов HaCaT, вызванное UVA-излучением [6–10]. Поскольку известно, что UV вызывает окислительный и генотоксический стресс [6], нам было важно проверить, может ли низкая доза UV (5 Дж/см²) способствовать изменениям в уровнях белков стресса. Результаты других авторов показывают, что даже низкая доза 6 Дж/см² UVA-излучения способна вызывать фрагментацию митохондрий, транслокацию нуклеоцитоплазмы, вызванную повреждением ДНК [7]. Показано, что низкая доза UV-излучения влияет на протеомную архитектуру клеток кожи, провоцируя реорганизацию субклеточных структур вследствие генотоксического и метаболического стрессов [7]. Экспрессия генов, связанных с клеточной смертью и апоптозом, не претерпевала значительных изменений в клетках HaCaT, подвергшихся воздействию UVA [8]. Несмотря на то, что влияние UVA на модификацию ДНК [9], экспрессию генов [10], экспрессию белков [11] и посттрансляционные модификации [12, 13]



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

уже изучено, информации о том, как UVA влияет на организацию белков подвижности в клетках эпидермиса, по-прежнему не хватает.

Развитие адаптивного ответа клеток кожи (тучные клетки, клетки Лангерганса, кератиноциты) реализуется через активацию многочисленных механизмов, обеспечивающих выживание клеток, одним из которых служит клеточная подвижность. Внутриклеточная подвижность необходима для возвращения клеток в состояние гомеостаза в ответ на воздействие UVA. Кроме того, подвижность клеток опосредует регенерацию тканей и играет важную роль во многих физиологических и патологических процессах, таких как заживление ран, миграция опухолевых метастатических клеток. Известно, что для усиления подвижности эпителиоподобных раковых клеток решающее значение имеет реорганизация актиновых филаментов, которые участвуют в поддержании формы клетки, транспорте различных молекул, клеточном делении и передаче сигнала [14]. Все формы рака кожи развиваются из эпидермальных клеток, главным образом из кератиноцитов [15]. Клеточная подвижность — это крайний случай масштабного ремоделирования актинового цитоскелета. Подвижность клеток обеспечивается, в основном, за счёт контролируемой сборки и разборки актинового цитоскелета. В области клеточной подвижности актуальность изучения молекулярных механизмов *in vitro* или поведения клеток в среде, далёкой от ткани, — предмет открытой дискуссии. Более точная характеристика белков, участвующих в процессе, должна способствовать углублённому пониманию реакции кожи на UVA-излучение. Известно, что низкая доза UVA-излучения, эквивалентная 20 мин полуденного пребывания на солнце [16] приводит к ремоделированию протеома клеток кожи.

Изучение изменений численности белков клеточной подвижности в ответ на облучение кератиноцитов HaCaT низкими дозами UVA может стать перспективным направлением для дальнейшего изучения молекулярных механизмов UV-индуцированного повреждения клеток и специфических для кожи защитных механизмов.

Эффективной стратегией изучения изменений протеома клеток является сравнительная протеомика — информативный метод для относительной количественной оценки без использования меток белкового состава биологических образцов [17].

Целью данной работы был сравнительный протеомный анализ белков ассоциированных с клеточной подвижностью в кератиноцитах HaCaT в ответ на экспозицию субтоксических для кожи доз UVA.

МЕТОДИКА

Реактивы

В работе использованы следующие реактивы: додецилсульфат натрия (SDS), бычий сывороточный альбумин (BSA; “Merck”, Германия); трипсин

из поджелудочной железы свиньи, модифицированный лиофилизированный (“Promega”, США); трифторуксусная кислота (ТФУ; “Fluka”, Германия); ацетонитрил, дитиотреитол (ДТТ), деионизованная вода (“Acros”, США); метанол, 2,2-бицинхониновая кислота (“Pierce”, США), 0,25% раствор трипсина-ЭДТА (“ПанЭко”, Россия) а также реактивы отечественного производства квалификации х.ч.

Культивирование и обработка клеток

Клетки иммортализованной клеточной линии HaCaT (“CLS Cell Lines Service”, Германия) высевали в 75 см² флаконы (“Corning”, США), культивирование проводили в среде DMEM/F12 1:1 (“ПанЭко”), содержащий 10% FBS (эмбриональной бычьей сыворотки, fetal bovine serum; “Диа-М”, Россия) и антибиотиков (100 ед/мл пенициллин и 100 мг/мл стрептомицин), в CO₂-инкубаторе (при температуре 37±1°C, влажности 90±10%, содержании CO₂ 5,0±1,0%). Среда инкубации меняли через день. После достижения 60–70% конfluence культуры среду отбирали, а клетки делили на три группы: контрольную и экспериментальные (по три чашки Петри на каждую группу). Кератиноциты рассаживали в 100 мм чашки Петри при плотности 3×10⁵ клеток на чашку за 48 ч до облучения и культивировали в стандартных условиях. Клетки промывали раствором DPBS (фосфатно-солевой буфер Дульбекко, “ПанЭко”) и помещали в камеру системы дозированного облучения Vilber BIO-LINK (5×8-watt, 365 нм; “Vilber”, Германия) под тонким слоем раствора DPBS. Время экспозиции с источником UVA подбирали таким образом, чтобы кумулятивная доза поглощённого излучения составляла 5 Дж/см² и 25 Дж/см². По завершению экспозиции раствор DPBS замещали на среду культивирования и клетки инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (при температуре 37±1°C, влажности 90±10%, содержании CO₂ 5,0±1,0%). Затем среду отбирали, клетки промывали PBS, снимали с помощью смеси 0,25% трипсин-ЭДТА (3 мл на чашку Петри) и инкубировали 2–3 мин при 37°C. Перед переносом клеток в центрифужную пробирку чашки Петри помещали под микроскоп, чтобы убедиться, что клетки полностью отделились от адгезивной поверхности чашек Петри. Кератиноциты центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин, затем трижды промывали ледяным калий-фосфатным буфером (pH 7,4). Буфер отбирали из пробирок и объединяли клетки трёх культуральных флаконов для каждой группы в одну пробирку (по 3 биологических повтора/культуральных флакона). В результате получали 3 образца/пробирки с контрольными (Control-HaCaT) и обработанными UVA (UVA1-HaCaT и UVA2-HaCaT) клетками. Осадок кератиноцитов растворяли в лизирующем буфере (500 мкл 0,2% SDS в 100 mM трис-HCl (pH 7,4), 120 mM NaCl, 5 mM ЭДТА и 1% PMSF) и лизаты гомогенизировали, как описано ранее [18]. Содержание белка в гомогенатах определяли при помощи 2,2-бицинхониновой кислоты при длине волны 562 нм с использованием БСА в качестве стандарта [19].

МТТ-тест

Клетки помещали в лунки 96-луночного планшета (6 лунок/технический повтор для каждого образца) в плотности 2500 клеток/лунка. Через 24 ч среду культивирования замещали 100 мкл раствора DPBS и облучали дозированно UVA (365 нм). После облучения раствор DPBS замещали свежей средой культивирования. Через 24 ч среду замещали на среду, содержащую 1 мг/мл МТТ (тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) и инкубировали при стандартных условиях (37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂) в течение 4 ч. По завершении инкубационного периода из лунок планшета удаляли среду и лизировали клетки в ДМСО. Оптическую плотность измеряли с помощью планшетного ридера iMark ("Bio-rad", США) при 560 нм [20]. Статистическую обработку различий в относительном росте количества клеток при культивировании проводили в программе GraphPad Prism 7.0, используя однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение. В качестве уровня статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Процедура электрофореза с последующим расщеплением трипсином в геле

Экстракты клеток HaCaT подвергали процедуре 1DE-гель концентрирования в полиакриламидном геле, как описано ранее [18]. Затем вырезали единственную белковую полосу (кусочек геля шириной около 2 мм) ручным микротомом, переносили в эппендорф и проводили гидролиз трипсином в геле, как описано Shevchenko и соавт. [21]. Надгелевый раствор смеси триптических пептидов из полосы геля использовали для проведения жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (LC-MS/MS).

LC-MS/MS протеомное профилирование

Протеомное профилирование выполняли с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 nano-flow HPLC ("Dionex", США), интегрированной с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive HF ("Thermo Scientific", США) с источником электростатической ионизации Nanospray Flex Ion Source ("Thermo Scientific") масс-спектрометра Orbitrap Q Exactive HF ("Thermo Scientific"), как описано ранее [18].

Для идентификации белков проводили анализ необработанных файлов с масс-спектрометра с использованием поискового алгоритма Andromeda [22], интегрированного в платформу MaxQuant software (v1.6.3.4) [23]. Параметры поиска: база данных SwissProt (v1.4.2019, формат FASTA) для вида *Homo sapiens*, расщепляющий фермент — трипсин/P; допустимая погрешность измерения моноизотопной массы пептида — $\pm 0,01$ Да, допустимая погрешность измерения фрагментного иона — $\pm 0,05$ Да, количество возможных пропущенных участков расщепления трипсином — 1; фиксированная

модификация — карбамидометилирование цистеина; переменная модификация — окисление метионина. В качестве режима количественного анализа использовали количественное определение без меток LFQ (label-free quantification). Поиск проводили по базе данных инвертированных и случайных последовательностей аминокислот (decoy); процент ложноположительных результатов (false discovery rate, FDR) был установлен на 0,01. Протеомный анализ проводили в трёх технических повторях. Величины коэффициентов интенсивности безметочного количественного анализа (LFQ intensity) для идентифицированных белков использовали далее как количественные показатели представленности белка в пробах. Белки, идентифицированные по двум и более уникальным пептидам с более чем 2-кратными изменениями (fold change ≥ 2) значений Intensity, расценивали как дифференциально изменённые в ответ на воздействие UVA. Статистическую значимость различий между сравниваемыми показателями определяли по критерию Стьюдента (*t*-критерий) для независимых выборок. Для контрольных клеток HaCaT выборка состояла из 6 технических повторов (масс-спектров), в случае кератиноцитов HaCaT после воздействия UVA1 и UVA2 — по 12 технических повторов. Результаты оценивали как статистически значимые при пороговом уровне статистической значимости (альфа уровень) 0,05. Для анализа биологических путей использовали базу данных Gene Ontology Database [24] и инструмент PANTHER [25] для работы с базой (вид — *Homo sapiens*, test type — binomial, онтология — GO-Slim Biological Process, p -value $< 0,05$). Построение диаграммы Венна и Gene Ontology анализ белков стресса проводили с помощью инструмента Functional Enrichment analysis (FunRich v. 3.1.3) [26]. Анализ обогащения протеома белок-белковыми взаимодействиями был выполнен с помощью онлайн-ресурса STRING (v. 12.0), рассматривали результаты для белков с минимальной достоверностью взаимодействий 0,7. Набор данных доступен в Mendeley Data [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам МТТ-теста оказалось, что для клеток линии HaCaT характерно дозозависимое снижение жизнеспособности при воздействии UVA. Как видно из рисунка 1 доза UVA 5 Дж/см² не вызывает снижение жизнеспособности кератиноцитов, при дозе 25 Дж/см² была отмечена 50% гибель кератиноцитов. Таким образом, по результатам МТТ-теста в соответствии с ISO 10993-5 считали дозу UVA 5 Дж/см² нетоксической, а 25 Дж/см² — токсической [28].

Для выявления специфических белков/метаболических путей, участвующих в процессах клеточной подвижности в эпидермисе человека, был проведён сравнительный анализ протеомов клеток HaCaT до и после облучения UVA двумя кумулятивными дозами поглощённого излучения 5 Дж/см² (UVA1) и 25 Дж/см² (UVA2).

Всего в иммортализованных кератиноцитах HaCaT по двум и более уникальным пептидам нами было идентифицировано 930 белков, из них 662 белка в контрольных образцах, 873 белка в UVA1 и 602 в UVA2 образцах. Список идентифицированных белков клеток линии HaCaT представлен в Дополнительных материалах (табл. S1). На рисунке 2 приведена диаграмма Венна, отражающая количество идентифицированных белков и их распределение в контрольных и опытных образцах клеток линии HaCaT.

Обнаружено 514 общих белков для всех трёх групп клеток, что указывает на сходство протеомов. Тем не менее, относительная количественная оценка протеомов показала изменения значений LFQ intensity для более половины (54,5%) всех идентифицированных белков, несмотря на низкие дозы поглощённого излучения, исследуемые в настоящей работе. В UVA1-HaCaT было зарегистрировано увеличение относительного содержания 476 белков и снижение содержания всего 4 белков по сравнению

с контрольными образцами. В образцах UVA2-HaCaT обнаружено повышение уровня регуляции 260 белков и снижение уровня регуляции 84 белков по сравнению с контролем.

Среди белков, относительное содержание которых увеличивалось наиболее сильно (кратность в среднем составляла 4,4) в образцах UVA1-HaCaT, 30 белков относились к биологическому процессу "Cell response to stress" (GO: 0033554) по классификации Gene Ontology [29]. Увеличение кумулятивной дозы UVA излучения до 25 Дж/см² привело к снижению количества стресс-индуцированных белков. В образцах UVA2-HaCaT было выявлено всего 15 таких белков, характеризующихся в среднем 3,7-кратным увеличением относительного содержания. Мы провели сравнительный анализ функционального обогащения белков стресса с повышенной регуляцией в кератиноцитах HaCaT после воздействия UVA1 и UVA2 с помощью FunRich (рис. 3).

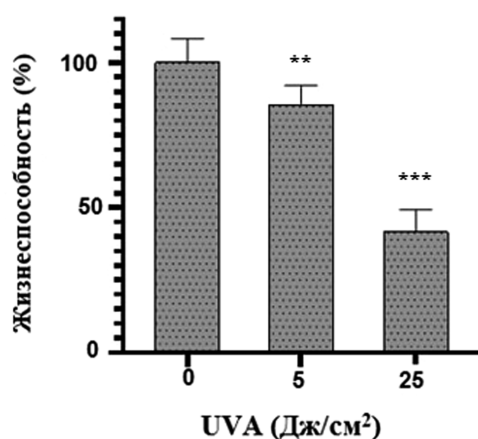


Рисунок 1. Дозозависимое снижение жизнеспособности кератиноцитов HaCaT в ответ на воздействие ультрафиолета А (UVA). Жизнеспособность клеток измеряли в процентах к необработанным контрольным культурам (n=6). Уровень статистической значимости ** $p < 0,0015$ для 5 Дж/см² и *** $p < 0,0001$ для 25 Дж/см².

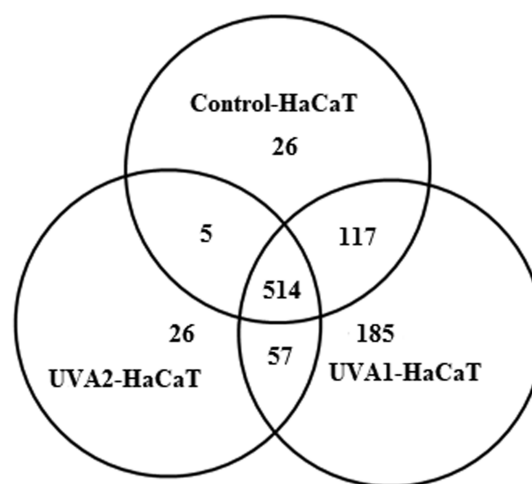


Рисунок 2. Диаграмма Венна: количество идентифицированных белков и их распределение в контрольных и опытных образцах клеток линии кератиноцитов HaCaT. Control-HaCaT – необработанные клетки HaCaT, UVA1-HaCaT – клетки облученные кумулятивной дозой поглощённого излучения 5 Дж/см², UVA2-HaCaT – клетки облученные дозой 25 Дж/см².

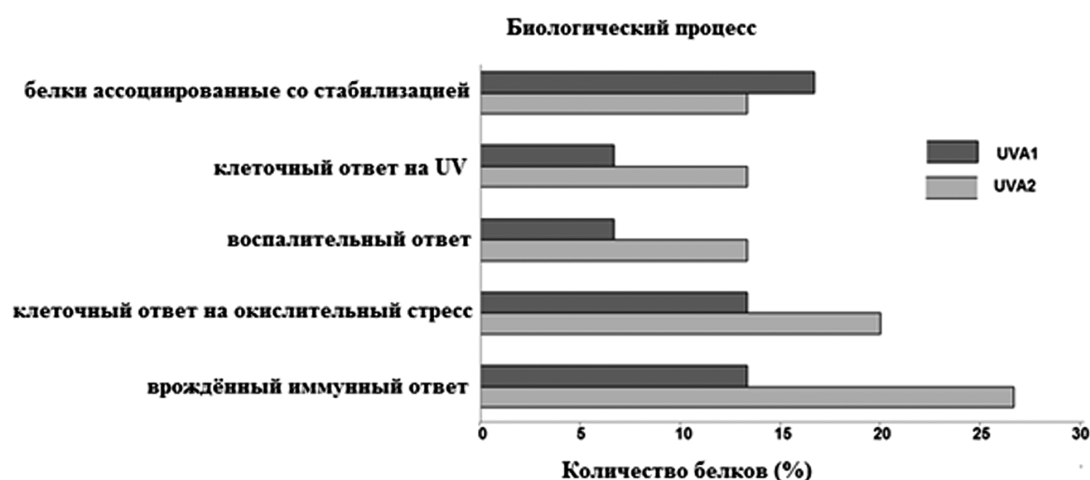


Рисунок 3. Анализ обогащения GO белков стресса с повышенным относительным содержанием в кератиноцитах HaCaT в ответ на экспозицию UVA (UVA1 – 5 Дж/см², UVA2 – 25 Дж/см²). Общее количество белков для данного процесса из базы данных UniProt принято за 100%.

Оказалось, что в образцах UVA2-HaCaT по сравнению с UVA1-HaCaT происходило увеличение доли белков, связанных с такими биологическими процессами как клеточный ответ на UV (cellular response to UV), клеточный ответ на окислительный стресс (cellular response to oxidative stress), воспалительный ответ (inflammatory response). При этом доля белков, ассоциированных со стабилизацией, снижается в клетках UVA2-HaCaT по сравнению с UVA1-HaCaT (рис. 3). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что доза UVA может существенно влиять на характер воздействия стресса (усиливать или подавлять тот или иной биологический процесс), что согласуется с данными литературы [7, 30, 31].

Список идентифицированных в клетках UVA-HaCaT белков, принимающих участие в ответе на стресс и изменения уровней их регуляции по сравнению с контрольными, представлены в Дополнительных материалах (табл. S2). Мы зарегистрировали повышение регуляции таких белков стресса, как XRCC6, PRDX1 и белков теплового шока, что согласуется с данными Valerio и соавт. [7]. Однако для белка PRDX3, уровень которого в цитируемой работе понижен, нами зарегистрировано 4- и 3-кратное повышение регуляции в образцах UVA1 и UVA2 соответственно (табл. S2). Обнаруженная разница в результатах воздействия низкой дозы UVA на HaCaT, полученных нами и авторами, может быть связана с тем, что метод панорамной протеомики имеет ряд ограничений, связанных с тем, что молекулярный ион не всегда регистрируется в масс-спектре и с разной фрагментацией образца. В нашей работе мы использовали трипсинолиз в геле, в то время как Valerio и соавт. — трипсинолиз в растворе, кроме того разница в результатах также могла быть обусловлена разными условиями лизиса клеток [7].

Мы использовали базу данных STRING (v.12.0) [32], для генерирования сети белок-белковых взаимодействий (PPI) для белков с повышенным уровнем регуляции в UVA-HaCaT (442 белка). Сеть PPI (PPI enrichment p -value: $<1,0 \times 10^{-16}$) была построена с требуемой (high confidence) оценкой взаимодействия 0,7. В результате было выявлено два основных кластера, для каждого из которых определено основное функциональное обогащение согласно GeneOntology. С точки зрения биологической функции, белки первого кластера вовлечены в клеточный ответ на стресс (358 белков), белки второго кластера ассоциированы с процессом связывания с кадгерином (39 белков). Белки семейства кадгеринов являются важной составной частью адгезивных контактов, контролирующей начало и конец миграции клеток, участвуют в формировании эпителиального пласта. Анализ белков сети PPI, относящихся к связыванию с кадгерином (Cadherin binding, GO: 0045296, кластер 2, рис. 4), выявил 11 белков, ассоциированных с биологическим процессом клеточной миграции (Cell migration, GO: 0016477), который ранее не был описан для кератиноцитов UVA-HaCaT на уровне протеома.

Выживание клеток в ответ на токсическое воздействие (UVA-излучение) реализуется через активацию многочисленных механизмов, один из которых — клеточная подвижность (в т.ч. клеточная миграция). Согласно GO иерархии, клеточная миграция — дочерний термин (Child term) по отношению к более широкому GO термину “клеточная подвижность” (Cell motility, GO: 0048870).

Для выявления белков, принимающих участие в клеточной подвижности кератиноцитов HaCaT до и после воздействия UVA, из базы данных “The Human Protein Atlas” (HPA) был извлечён соответствующий список белков человека, содержащий 355 аннотаций [33]. Из них для кератиноцитов человека список составил 31 аннотацию. Сравнение этих двух списков HPA специфических белков клеточной подвижности с протеомами клеток HaCaT до и после воздействия UVA позволило выявить 23 белка (табл. 1). Такое количество идентификаций соответствовало 6,5% от общего числа белков HPA регулирующих клеточную подвижность и 74,2% от числа кератиноцит-специфичных белков подвижности человека.

Из данных таблицы 1 видно, что мы зарегистрировали значительные изменения уровня регуляции белков даже после облучения очень низкой дозой UV (5 Дж/см²) ультрафиолета. Из них 17 белков значительно увеличили значение LFQ intensity в UVA1-HaCaT по сравнению с контрольными образцами кератиноцитов; интенсивность 6 белков практически не изменилась. При этом в образцах UVA2-HaCaT только 8 белков характеризовались более высокими значениями LFQ intensity, относительное содержание 9 белков не изменилось, а 6 уменьшилось по сравнению с контрольными образцами.

Большинство белков клеточной подвижности участвуют в образовании актиновых микрофиламентов. Нами зарегистрировано 2-кратное повышение регуляции важного для клеточной подвижности и миграции белка Fascin (FSCN1_HUMAN) в опытных клетках по сравнению с контрольными. Это актин-связывающий белок, играющий роль в организации пучков актиновых филаментов. Был идентифицирован белок Transforming protein RhoA (RHOA_HUMAN), способствующий реорганизации актинового цитоскелета и регулирующий подвижность клеток, стимулируя Rho-associated kinase (ROCK), который, активируя LIM-киназу, приводит к инактивации кофилина, тем самым стабилизируя актиновые филаменты [34, 35]. В нашем исследовании уровень RHOA практически не изменился в UVA-HaCaT, что указывает на незначительные повреждения клеток кератиноцитов после облучения. Это согласуется с данными литературы о том, что UVA-излучение не вызывает заметных нарушений направленности движения клеток HaCaT [36]. Тем не менее, согласно нашим данным, из 31 белков которые были аннотированы как вовлечённые в процесс клеточной подвижности, уровень 20 белков существенно изменился (табл. 1). Из них цитоскелетные актин-связывающие белки

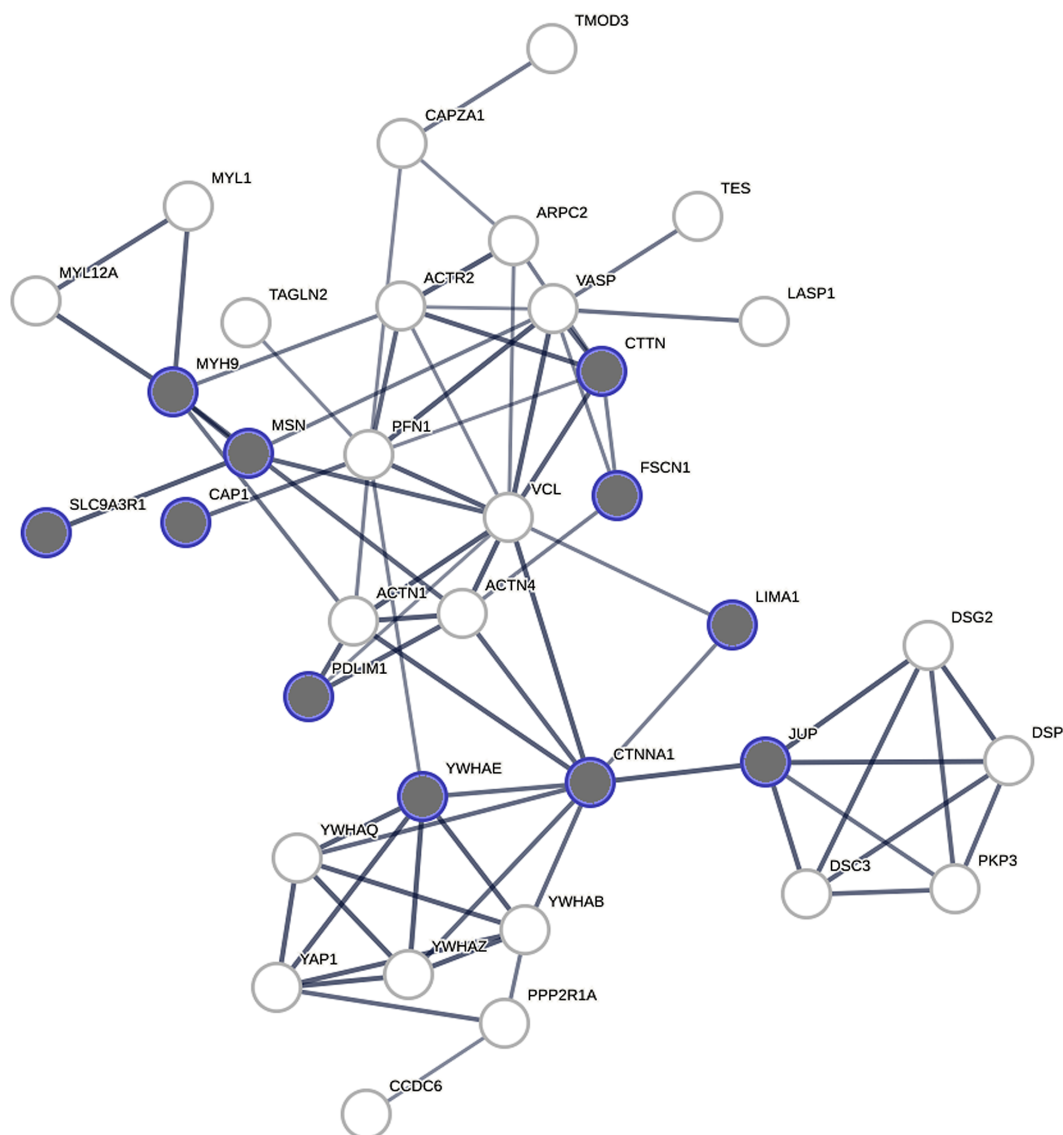


Рисунок 4. Сеть белок-белковых взаимодействий для белков (PPI enrichment p -value: $<1,0 \times 10^{-16}$) с повышенным уровнем в UVA-HaCaT, полученная с помощью инструмента STRING (версия 12.0, минимальная требуемая оценка взаимодействия 0,7). Серым цветом обозначены белки, связанные с биологическим процессом “миграция клеток” (Cell migration, GO: 0016477).

были основной группой, регулирующей клеточную подвижность кератиноцитов, стимулируемую UVA-излучением. Сравнение с данными, полученными для более высоких доз облучения не показательно, так как экспрессия генов, связанных с клеточной смертью и апоптозом, не претерпевала значительных изменений в клетках HaCaT, подвергшихся воздействию UVA [8].

Известно, что в подвижных клетках белок RAC1 управляет формированием сети полимеризации актина [37]. Увеличение уровня этого белка не было значимым в условиях UVA1, а в UVA2 относительный уровень его содержания увеличился в 3 раза по сравнению с контролем. Это может свидетельствовать о более значительном развитии адаптивного ответа на воздействие UVA в клетках UVA2-HaCaT для возвращения клеток в состояние гомеостаза. В связи с этим следует отметить, что клетки HaCaT лишь незначительно

снижают пролиферацию при облучении, восстанавливая свою пролиферативную способность в долгосрочной перспективе [38].

Из данных таблицы 1 видно, изменение уровня некоторых белков кератиноцитов HaCaT (увеличение или снижение) зависело от дозы облучения. Например, в UVA1-HaCaT уровень белков PLEC, MYH9, SRC8, PHP14, BICD2, KTN1 повысился, а в UVA2-HaCaT понизился.

Разнонаправленная регуляция отмечена и для белка Plectin (PLEC_HUMAN), который участвует в развитии кератиноцитов, морфогенезе клетки и клеточном ответе на стимулы [39]. В клетках UVA1-HaCaT мы обнаружили 2-кратное увеличение, в то время как в клетках UVA2-HaCaT было отмечено 2-кратное уменьшение уровня этого белка. Для белка Src substrate cortactin (SRC8_HUMAN) также было зарегистрировано 2-кратное увеличение в UVA1-HaCaT и 3-кратное уменьшение в UVA2-HaCaT.

Таблица 1. Белки, отнесённые к категории клеточной подвижности в клетках NaCaT, подвергнутых воздействию UVA-излучения

№ п/п	Идентификатор	Название белка	Молекулярная масса, кДа	Коэффициент интенсивности				Кратность изменения UV1/control	Кратность изменения UV2/control	Биологический процесс (заболевание)
				Control	UVA1	UVA2	UVA2			
1	P61586	Transforming protein RhoA (RHOA_HUMAN)	21,77	4,26E8±1,07E8	5,39E8±1,29E8	3,68E8±3,31E7	0,86±0,14	1,27±0,02	0,86±0,14	организация цитоплазматических микротрубочек, миграция клеток, адгезия клеток к матриксу, регуляция организации актинового цитоскелета, сигнальный путь Wnt, путь плоскостной клеточной полярности (эктодермальная дисплазия)
2	P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1_HUMAN)	21,45	7,28E7±1,60E7	1,15E8±4,70E7	2,23E8±7,58E7	3,07±0,40	1,58±0,30	3,07±0,40	регуляция организации актинового цитоскелета, миграция клеток, клеточная подвижность, реакция на ранение, регуляция сборки ламеллиподиев, клеточная адгезия
3	Q16658	Fascin (FSCN1_HUMAN)	54,53	1,37E9±2,74E8	3,45E9±4,10E8	2,85E9±3,70E8	2,08±0,15	2,51±0,20	2,08±0,15	регуляция организации актинового цитоскелета, клеточной подвижности, установления или поддержания клеточной полярности, позитивная регуляция сборки ламеллиподиев
4	Q15149	Plectin (PLEC_HUMAN)	531,78	2,72E7±6,80E6	5,70E7±1,03E7	1,19E7±1,78E6	0,44±0,05	2,10±0,20	0,44±0,05	развитие кератиноцитов, клеточный ответ на внеклеточный стимул, клеточный морфогенез, заживление ран (буллёзный эпидермолиз)
5	O14745	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1 (NHRF1_HUMAN)	38,87	7,15E8±1,36E8	1,88E9±1,50E8	4,15E8±3,73E7	0,58±0,06	2,63±0,30	0,58±0,06	морфогенез эпителия, негативная регуляция пролиферации клеточных популяций, регуляция формы и размера клеток, организация плазматической мембраны
6	P16144	Integrin beta-4 (ITB4_HUMAN)	202,16	4,53E8±8,60E7	8,58E8±8,50E7	2,42E8±3,15E7	0,53±0,03	1,89±0,18	0,53±0,03	клеточная адгезия, клеточная подвижность, реакция на ранение, морфогенез кожи (форма буллёзного эпидермолиза, генодерматоз)
7	P35221	Catenin alpha-1 (CTNNA1_HUMAN)	100,07	7,42E8±1,70E8	3,52E9±3,17E8	1,39E9±4,50E8	1,87±0,20	4,74±0,70	1,87±0,20	межклеточная адгезия, негативная регуляция клеточной подвижности, установление или поддержание клеточной полярности
8	P35579	Myosin-9 (MYH9_HUMAN)	226,53	2,77E8±5,80E7	6,03E8±2,40E7	3,26E7±1,14E7	0,12±0,02	2,18±0,30	0,12±0,02	способствует подвижности клеток в комплексе с S100A4, организации актинового цитоскелета, регуляции формы клеток, организации мейотического веретена
9	Q14247	Src substrate cortactin (SRC8_HUMAN)	61,59	2,93E9±3,80E8	5,83E9±7,58E8	8,83E8±1,50E8	0,30±0,02	1,99±0,05	0,30±0,02	организация актинового цитоскелета, клеточная подвижность, сборка фокальных адгезий, организация ламеллиподия, положительная регуляция полимеризации актиновых филаментов
10	P61160	Actin-related protein 2 (ARP2_HUMAN)	44,76	6,83E7±2,32E7	1,81E8±2,17E7	2,13E8±2,10E7	3,12±0,80	2,65±0,60	3,12±0,80	опосредованный комплексом Arp2/3 синтез актина, цитозольный транспорт, клеточная полярность, положительная регуляция сборки ламеллиподиев

Таблица 1. Белки, отнесённые к категории клеточной подвижности в клетках NaCaT, подвергнутых воздействию UVA-излучения (продолжение)

№ п/п	Идентификатор	Название белка	Молекулярная масса, кДа	Коэффициент интенсивности				Кратность изменения UV1/control	Кратность изменения UV2/control	Биологический процесс (заболевание)
				Control	UVA1	UVA2				
11	P31949	Protein S100-A11 (S10AB_HUMAN)	11,74	2,06E9±4,12E8	9,92E9±1,19E9	4,32E9±1,72E9		4,81±0,40	2,09±0,40	негативная регуляция пролиферации клеточной популяции, транскдукция сигналов, способствует дифференцировке и ороговению кератиноцитов
12	P09758	Tumor-associated calcium signal transducer 2 (TACD2_HUMAN)	35,71	5,22E8±5,1E7	2,42E9±4,84E8	4,02E8±6,83E7		4,64±0,50	0,77±0,06	негативная регуляция подвижности клеток, регуляция пролиферации эпителиальных клеток
13	O15144	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (ARPC2_HUMAN)	34,33	5,06E7±1,77E7	3,30E8±9,24E7	1,70E8±1,20E7		6,52±0,50	3,36±1,00	зависимая от полимеризации актина клеточная подвижность, Apr2/3 комплекс-опосредованное зарождение актина, положительная регуляция сборки ламеллиподиев
14	P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP_HUMAN)	39,83	5,23E7±1,62E7	1,37E8±4,52E7	5,52E7±1,15E7		2,62±0,08	1,06±0,12	организация актинового цитоскелета, положительная регуляция полимеризации актиновых филаментов
15	P40121	Macrophage-capping protein (CAPG_HUMAN)	38,50	2,32E8±1,86E7	7,45E8±1,34E8	4,03E8±1,05E8		3,21±0,32	1,74±0,40	разрыв актиновых нитей, полимеризация или деполимеризация актина
16	P06744	Glucose-6- phosphate isomerase (G6PI_HUMAN)	63,15	6,28E8±1,63E8	9,13E8±1,82E8	1,23E9±2,09E8		1,45±0,10	1,96±0,20	гомеостаз глюкозы, положительная регуляция миграции эндотелиальных клеток, гуморальный иммунный ответ
17	Q9P0L0	Vesicle-associated membrane protein- associated protein A (VAPA_HUMAN)	27,89	1,08E8±3,13E7	3,48E8±9,04E7	1,23E8±3,40E7		3,22±0,10	1,14±0,02	биосинтез сфинголипидов, клеточная смерть, регуляция транспорта липидов и синтеза мембран в эндоплазматическом ретикулуме
18	P29966	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCS_HUMAN)	31,55	3,45E7±1,1E7	4,56E7±1,87E7	nd		1,32±0,13	—	организация митохондрий, реакция на стресс эндоплазматического ретикулума, организация актиновых филаментов, апоптотический процесс
19	Q9NRX4	14 kDa phosphohistidine- phosphatase (PHP14_HUMAN)	13,83	7,51E7±2,48E7	1,65E8±4,78E7	1,14E7±1,03E6		2,20±0,10	0,15±0,04	организация актинового цитоскелета, организация ламеллиподия, положительная регуляция клеточной подвижности
20	Q6NZI2	Caveolae-associated protein 1 (CAVN1_HUMAN)	43,48	5,35E8±1,60E7	2,63E9±7,36E8	8,88E8±1,95E8		4,92±1,20	1,66±0,30	положительная регуляция клеточной подвижности, секреции белков, транскрипции рРНК
21	Q8TD16	Protein bicaudal D homolog 2 (BICD2_HUMAN)	93,53	3,95E8±6,32E7	8,92E8±2,23E8	4,80E7±1,10E7		2,26±0,20	0,12±0,01	движение по микротрубочкам, транспорт белков, регуляция организации цитоскелета, микротрубочек, локализация белков в аппарате Гольджи
22	Q86UP2	Kinectin (KTNI_HUMAN)	156,27	1,13E9±1,24E8	1,96E9±5,5E8	3,27E7±1,28E7		1,73±0,30	0,03±0,01	движение по микротрубочкам, транспорт белков
23	Q9GZT3	SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial (SLIRP_HUMAN)	12,35	5,73E7±1,9E7	4,25E8±1,44E8	4,41E7±6,61E6		7,40±0,08	0,77±0,15	организация митохондрий, РНК-связывающий белок, действующий как корепрессор ядерных рецепторов

Белок SRC8 участвует в организации актинового цитоскелета и формировании формы клеток, играет роль во внутриклеточном транспорте белков и подвижности клеток [40]. Уменьшение содержания этого белка при воздействии на кератиноциты HaCaT кумулятивной дозой UVA 25 Дж/см² может свидетельствовать о снижении клеточной подвижности вдоль микротрубочек в UVA2-HaCaT. В то же время известно, что сверхэкспрессия SRC8 ассоциируется с плохим прогнозом при разных видах рака и способствует миграции и инвазии клеток рака желудка SGC-7901 *in vitro* [41].

Четыре белка продемонстрировали существенное снижение значений LFQ intensity в ответ на воздействие UVA 25 Дж/см². Наиболее сильное (30-кратное) понижение уровня в UVA2-HaCaT было зарегистрировано для белка Kinectin (KTN1_HUMAN), который участвует в движении везикул и транспорте белков [42]. Уровень белков MYH9 и BICD2, участвующих в регуляции формы клетки и восстановлении плазматической мембраны и способствующих клеточной подвижности [43, 44], существенно (в 8 раз) снизился в UVA2-HaCaT. Уровень фосфатазы PHP14, участвующей в регуляции клеточной подвижности в UVA2-HaCaT снижался в 6 раз [45].

Используя сравнительный анализ протеомов кератиноцитов HaCaT, мы выявили белки, уровень которых повысился в UVA1-HaCaT (кратность в среднем 4,4) по сравнению с контролем и незначительно изменился (относительно контрольных образцов) в UVA2-HaCaT: CTNA1, TACD2, VASP, CAPG, VAPA, CAVN1 и SLIRP (табл. 1). Белки CTNA1 и TACD2 участвуют в негативной регуляции клеточной подвижности [46]. Согласно базе данных UniProt, CTNA1 обеспечивает межклеточную адгезию и поддерживает полярность клетки, а TACD2 регулирует пролиферацию в ответ на стимул. Белок CAPG — компонент актинового цитоскелета — играет роль в полимеризации или деполимеризации актина, VASP — способствует удлинению актиновых нитей, организации актинового цитоскелета [47].

CAVN1 играет важную роль в формировании и организации кавеол, участвует в положительной регуляции клеточной подвижности [48]. Нами зарегистрировано значительное повышение уровня регуляции белков ARP2 и ARPC2 как в UVA1-HaCaT, так и в UVA2-HaCaT. Эти белки являются компонентами комплекса Arp2/3, опосредующего полимеризацию актина и обеспечивающего клеточную подвижность [49]. Представляют интерес белки, уровень которых изменяется разнонаправленно в кератиноцитах, облучённых нетоксичной и токсичной для HaCaT дозой UVA. Уменьшение содержания белков при воздействии на кератиноциты HaCaT кумулятивной дозой UVA 25 Дж/см² может свидетельствовать о снижении клеточной подвижности вдоль микротрубочек в UVA2-HaCaT.

Таким образом, наши результаты показали, что UVA стимулирует подвижность клеток кератиноцитов человека, и мы зафиксировали белки, вовлечённые в этот процесс. Совокупность

полученных данных может свидетельствовать о том, что изменение уровня регуляции ряда белков, задействованных во внутриклеточной подвижности (RAC1, CTNA1, PLEC, TACD2, SRC8, MYH9, PHP14, BICD2, KTN1), является проявлением адаптационной реакции клеток на воздействие субтоксических доз UVA для возвращения клеток в состояние гомеостаза [50–52].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью панорамного протеомного профилирования кератиноцитов HaCaT после облучения UVA кумулятивными дозами поглощённого излучения 5 Дж/см² (UVA1-HaCaT) и 25 Дж/см² (UVA2-HaCaT) были выявлены белки, ассоциированные с биологическим процессом “клеточная подвижность” (“Cell motility”, GO: 0048870). Основная группа, регулирующая клеточную подвижность кератиноцитов в ответ на UVA-излучение — цитоскелетные актин-связывающие белки (RAC1, CTNA1, PLEC, TACD2, SRC8, MYH9, PHP14, BICD2, KTN1). Предполагается, что изменение содержания этих белков — это проявление адаптационной реакции клеток на воздействие субтоксических доз UVA для возвращения клеток в состояние гомеостаза. Зарегистрированные нами изменения уровня регуляции белков клеточной подвижности не были ранее описаны для кератиноцитов HaCaT в ответ на UVA. Таким образом, изучение изменений содержания этих белков в клеточной линии HaCaT, по-видимому, может стать перспективным направлением для дальнейшего изучения молекулярных механизмов UVA-индуцированного повреждения клеток и использоваться для изучения физиологических и патологических процессов, в частности, при ранениях и заживлении ран.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические измерения выполняли на оборудовании ЦКП “Протеом человека” Института биомедицинской химии (Россия).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100170-5).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительные материалы доступны в электронной версии статьи на сайте журнала (pbmc.ibmc.msk.ru).

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramadan Q., Ting F.C. (2016) *In vitro* micro-physiological immune-competent model of the human skin. *Lab. Chip*, **16**(10), 1899–1908. DOI: 10.1039/c6lc00229c
2. Muller H.K., Woods G.M. (2013) Ultraviolet radiation effects on the proteome of skin cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **990**, 111–119. DOI: 10.1007/978-94-007-5896-4_8
3. Adachi M., Gazel A., Pintucci G., Shuck A., Shifteh S., Ginsburg D., Rao L.S., Kaneko T., Freedberg I.M., Tamaki K., Blumenberg M. (2003) Specificity in stress response: epidermal keratinocytes exhibit specialized UV-responsive signal transduction pathways. *DNA Cell Biol.*, **22**(10), 665–677. DOI: 10.1089/104454903770238148
4. York N.R., Jacobs H.T. (2010) UVA1 phototherapy: a review of mechanism and therapeutic application. *Int. J. Dermatol.*, **49**(6), 623–630. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2009.04427.x
5. Barros N.M., Sbroglio L.L., Buffara M.O., Baka J.L.C.E.S., Pessoa A.S., Azulay-Abulafia L. (2021) Phototherapy. *An. Bras. Dermatol.*, **96**(4), 397–407. DOI: 10.1016/j.abd.2021.03.001
6. Schuch A.P., Moreno N.C., Schuch N.J., Menck C.F.M., Garcia C.C.M. (2017) Sunlight damage to cellular DNA: focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic. Biol. Med.*, **107**, 110–124. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.029
7. Valerio H.P., Ravagnani F.G., Yaya Candela A.P., Dias Carvalho da Costa B., Ronsein G.E., di Mascio P. (2022) Spatial proteomics reveals subcellular reorganization in human keratinocytes exposed to UVA light. *iScience*, **25**(4), 104093. DOI: 10.1016/j.isci.2022.104093
8. Marais T.L.D., Kluz T., Xu D., Zhang X., Gesumaria L., Matsui M.S., Costa M., Sun H. (2017) Transcription factors and stress response gene alterations in human keratinocytes following solar simulated ultra violet radiation. *Sci. Rep.*, **7**(1), 13622. DOI: 10.1038/s41598-017-13765-7
9. Moreno N.C., de Souza T.A., Garcia C.C.M., Ruiz N.Q., Corradi C., Castro L.P., Munford V., Ienne S., Alexandrov L.B., Menck C.F.M. (2020) Whole-exome sequencing reveals the impact of UVA light mutagenesis in xeroderma pigmentosum variant human cells. *Nucleic Acids Res.*, **48**(4), 1941–1953. DOI: 10.1093/nar/gkz1182
10. He Y.Y., Huang J.L., Sik R.H., Liu J., Waalkes M.P., Chignell C.F. (2004) Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *J. Invest. Dermatol.*, **122**(2), 533–543. DOI: 10.1046/j.0022-202X.2003.22123.x
11. Edifizi D., Nolte H., Babu V., Castells-Roca L., Mueller M.M., Brodessa S., Krüger M., Schumacher B. (2017) Multilayered reprogramming in response to persistent DNA damage in *C. elegans*. *Cell Rep.*, **20**(9), 2026–2043. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.028
12. Elia A.E., Boardman A.P., Wang D.C., Huttlin E.L., Everley R.A., Dephoure N., Zhou C., Koren I., Gygi S.P., Elledge S.J. (2015) Quantitative proteomic atlas of ubiquitination and acetylation in the DNA damage response. *Mol. Cell*, **59**(5), 867–881. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.006
13. Zhou C., Elia A.E., Naylor M.L., Dephoure N., Ballif B.A., Goel G., Xu Q., Ng A., Chou D.M., Xavier R.J., Gygi S.P., Elledge S.J. (2016) Profiling DNA damage-induced phosphorylation in budding yeast reveals diverse signaling networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**(26), 3667–3675. DOI: 10.1073/pnas.1602827113
14. Thiery J.P., Acloque H., Huang R.Y.J., Nieto M.A. (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, **139**(5), 871–890. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.007
15. Victorelli S., Lagnado A., Halim J., Moore W., Talbot D., Barrett K., Chapman J., Birch J., Ogrodnik M., Meves A., Pawlikowski J.S., Jurk D., Adams P.D., van Heemst D., Beekman M., Slagboom P.E., Gunn D.A., Passos J.F. (2019) Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *EMBO J.*, **38**(23), e101982. DOI: 10.15252/embj.2019101982
16. Halliday G.M., Rana S. (2008) Waveband and dose dependency of sunlight-induced immunomodulation and cellular changes. *Photochem. Photobiol.*, **84**(1), 35–46. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00212.x
17. Копылов А.Т., Згода В.Г., Арчаков А.И. (2009) Количественный масс-спектрометрический анализ содержания белков в биологических пробах без использования изотопных меток. *Биомедицинская химия*, **55**(2), 125–139. [Kopylov A.T., Zgoda V.G., Archakov A.I. (2009) Label-free quantitative analysis of proteins using mass-spectrometry. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **55**(2), 125–139.] DOI: 10.1134/S1990750810010075
18. Кисрюева Ю.С., Саменкова Н.Ф., Шкригунов Т.С., Ларина О.В., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г., Казиева Л.Ш., Карузина И.И., Петушкова Н.А. (2023) Сравнительный анализ протеомного профиля кератиноцитов HaCaT с использованием 1DE-гель концентрирования. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(2), e00180. [Kisrueva Yu.S., Samenkova N.F., Shkrigunov T.S., Larina O.B., Rusanov A.L., Luzgina N.G., Kazieva L.Sh., Karuzina I.I., Petushkova N.A. (2023) Comparative analysis of the proteomic profile of HaCaT keratinocytes using a 1DE concentrating gel. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **6**(2), e00180.] DOI: 10.18097/BMCRM00180
19. Walker J.M. (1994) The biconchonic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol. Biol.*, **32**, 5–8. DOI: 10.1385/0-89603-268-X:5
20. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**(1–2), 55–63. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
21. Shevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.*, **1**(6), 2856–2860. DOI: 10.1038/nprot.2006.468
22. Cox J., Neuhauser N., Michalski A., Scheltema R.A., Olsen J.V., Mann M. (2011) Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.*, **10**(4), 1794–1805. DOI: 10.1021/pr101065j
23. Cox J., Mann M. (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.*, **26**(12), 1367–1372. DOI: 10.1038/nbt.1511
24. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.*, **25**(1), 25–29. DOI: 10.1038/75556
25. Mi H., Thomas P. (2009) PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol. Biol.*, **563**, 123–140. DOI: 10.1007/978-1-60761-175-2_7
26. Fonseka P., Pathan M., Chitti S.V., Kang T., Mathivanan S. (2021) FunRich enables enrichment analysis of OMICs datasets. *J. Mol. Biol.*, **433**(11), 166747. DOI: 10.1016/j.jmb.2020.166747

27. Kisrieva Iu., Samenkova N., Bolochenkov N., Rusanov A., Romashin D., Solovyeva N., Karuzina I., Lisitsa A., Petushkova N. (2024) The effects of low-doses UVA irradiation on HaCaT keratinocytes, Mendeley Data, V1, DOI: 10.17632/hk66jsxzrr.1
28. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009 (2010) Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. [ISO 10993-5:2009 (2010) Biological evaluation of medical devices — part 5: tests for *in vitro* cytotoxicity. International Organization for Standardization.] Retrieved from; <https://docs.cntd.ru/document/1200079287>
29. Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D., Yakhini Z. (2009) GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. BMC Bioinformatics, **10**, 48(2009). DOI: 10.1186/1471-2105-10-48
30. Dhabhar F.S. (2000) Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. Ann. NY Acad. Sci., **917**, 876–893. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x
31. Zhao Q., Chen Y., Qu L. (2023) Combined transcriptomic and proteomic analyses reveal the different responses to UVA and UVB radiation in human keratinocytes. Photochem. Photobiol., **99**(1), 137–152. DOI: 10.1111/php.13658
32. Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A.L., Fang T., Doncheva N.T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. (2023) The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. Nucleic Acids. Res., **51**(D1), D638–D646. DOI: 10.1093/nar/gkac1000
33. Uhlén M., Fagerberg L., Hallström B.M., Lindskog C., Oksvold P., Mardinoglu A., Sivertsson Å., Kampf C., Sjöstedt E., Asplund A., Olsson I., Edlund K., Lundberg E., Navani S., Szigartyo C.A., Odeberg J., Djureinovic D., Takanen J.O., Hober S., Alm T., Edqvist P.H., Berling H., Tegel H., Mulder J., Rockberg J., Nilsson P., Schwenk J.M., Hamsten M., von Feilitzen K., Forsberg M., Persson L., Johansson F., Zwahlen M., von Heijne G., Nielsen J., Pontén F. (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. Science, **347**(6220), 6220. DOI: 10.1126/science.1260419
34. Sumi T., Matsumoto K., Nakamura T. (2001) Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. J. Biol. Chem., **276**(1), 670–676. DOI: 10.1074/jbc.M007074200
35. Baudry M., Su W., Bi X. (2023) The Calpain Proteolytic System. In: Encyclopedia of Cell Biology (Bradshaw R.A., Hart G.W., Stahl P.D., eds.), Second Edition, Academic Press, pp. 852–864. DOI: 10.1016/B978-0-12-821618-7.00223-6
36. Niculițe C.M., Nechifor M.T., Urs A.O., Olariu L., Ceafalan L.C., Leabu M. (2018) Keratinocyte motility is affected by UVA radiation — a comparison between normal and dysplastic cells. Int. J. Mol. Sci., **19**(6), 1700. DOI: 10.3390/ijms19061700
37. Raftopoulou M., Hall A. (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. Dev. Biol., **265**(1), 23–32. DOI: 10.1016/j.ydbio.2003.06.003
38. Valerio H.P., Ravagnani F.G., Ronsein G.E., di Mascio P. (2021) A single dose of ultraviolet-A induces proteome remodeling and senescence in primary human keratinocytes. Sci. Rep., **11**(1), 23355. DOI: 10.1038/s41598-021-02658-5
39. Zrelski M.M., Hösele S., Kustermann M., Fichtinger P., Kah D., Athanasiou I., Esser P.R., Wagner A., Herzog R., Kratochwill K., Goldmann W.H., Kiritsi D., Winter L. (2024) Plectin deficiency in fibroblasts deranges intermediate filament and organelle morphology, migration, and adhesion. J. Invest. Dermatol., **144**(3), 547–562. DOI: 10.1016/j.jid.2023.08.020
40. Yin M., Ma W., An L. (2017) Cortactin in cancer cell migration and invasion. Oncotarget, **8**(50), 88232–88243. DOI: 10.18632/oncotarget.21088
41. Wei J., Zhao Z.-X., Li Y., Zhou Z.-Q., You T.-G. (2014) Cortactin expression confers a more malignant phenotype to gastric cancer SGC-7901 cells. World J. Gastroenterol., **20**(12), 3287–3300. DOI: 10.3748/wjg.v20.i12.3287
42. Niu X., Shen Y., Wen Y., Mi X., Xie J., Zhang Y., Ding Z. (2024) KTN1 mediated unfolded protein response protects keratinocytes from ionizing radiation-induced DNA damage. J. Dermatol. Sci., **114**(1), 24–33. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2024.02.006
43. Zehrer A., Pick R., Salvermoser M., Boda A., Miller M., Stark K., Weckbach L.T., Walzog B., Begandt D. (2018) A fundamental role of Myh9 for neutrophil migration in innate immunity. J. Immunol., **201**(6), 1748–1764. DOI: 10.4049/jimmunol.1701400
44. Hoogenraad C.C., Wulf P., Schiefermeier N., Stepanova T., Galjart N., Small J.V., Grosveld F., de Zeeuw C.I., Akhmanova A. (2003) Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. EMBO J., **22**(22), 6004–6015. DOI: 10.1093/emboj/cdg592
45. Xu A., Hao J., Zhang Z., Tian T., Jiang S., Hao J., Liu C., Huang L., Xiao X., He D. (2010) 14-kDa phosphohistidine phosphatase and its role in human lung cancer cell migration and invasion. Lung Cancer, **67**(1), 48–56. DOI: 10.1016/j.lungcan.2009.03.005
46. Nakatsukasa M., Kawasaki S., Yamasaki K., Fukuoka H., Matsuda A., Tsujikawa M., Tanioka H., Nagata-Takaoka M., Hamuro J., Kinoshita S. (2010) Tumor-associated calcium signal transducer 2 is required for the proper subcellular localization of claudin 1 and 7: implications in the pathogenesis of gelatinous drop-like corneal dystrophy. Am. J. Pathol., **177**(3), 1344–1355. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100149
47. Grosse R., Copeland J.W., Newsome T.P., Way M., Treisman R. (2003) A role for VASP in RhoA-diaphanous signalling to actin dynamics and SRF activity. EMBO J., **22**(12), 3050–3061. DOI: 10.1093/emboj/cdg287
48. Takamura N., Yamaguchi Y. (2022) Involvement of caveolin-1 in skin diseases. Front Immunol., **13**, 1035451. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1035451
49. Pollard T.D., Borisy G.G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. Cell, **112**(4), 453–465. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00120-x
50. Golebiewski C., Gastaldi C., Vieu D.L., Mari B., Rezzonico R., Bernerd F., Marionnet C. (2023) Identification and functional validation of SRC and RAPGEF1 as new direct targets of miR-203, involved in regulation of epidermal homeostasis. Sci. Rep., **13**(1), 14006. DOI: 10.1038/s41598-023-40441-w
51. Prechova M., Adamova Z., Schweizer A.-L., Maninova M., Bauer A., Kah D., Meier-Menches S.M., Wiche G., Fabry B., Gregor M. (2022) Plectin-mediated cytoskeletal crosstalk controls cell tension and cohesion in epithelial sheets. J. Cell. Biol., **221**(3), e202105146. DOI: 10.1083/jcb.202105146
52. Huang Y., Gui J., Myllymäki S.-M., Roy K., Tõnissoo T., Mikkola M.L., Shimmi O. (2022) Scribble and α -catenin cooperatively regulate epithelial homeostasis and growth. Front Cell Dev. Biol., **10**, 912001. DOI: 10.3389/fcell.2022.912001

Поступила в редакцию: 29. 05. 2024.
После доработки: 05. 03. 2025.
Принята к печати: 31. 03. 2025.

**CHANGES IN THE CELL MOTILITY PROTEINS PROFILE
IN THE HaCaT KERATINOCYTES RESPONSE TO THE UVA EXPOSURE**

Iu.S. Kisrieva, N.F. Samenkova, N.A. Bolochenkoy, A.L. Rusanov, D.D. Romashin,
N.A. Solovyeva, I.I. Karuzina, A.V. Lisitsa, N.A. Petushkova*

Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: juliaks@bk.ru

A comparative analysis of HaCaT keratinocyte proteins has been performed after cell exposure to subtoxic doses (5 J/cm² and 25 J/cm²) of ultraviolet A (UVA) radiation. 930 proteins were identified by two or more unique peptides. More than half of all identified proteins (54.5%) demonstrated at least 2-fold increase in their relative content after HaCaT keratinocyte irradiation with a cumulative dose of 5 J/cm², while a decrease in the relative content was found only for 4 proteins. Irradiation of keratinocytes with a cumulative dose of 25 J/cm² resulted in a decrease in the proportion of up-regulated proteins (43.0%) and an increase in the number of down-regulated proteins (84). Among the proteins with increased relative content in HaCaT keratinocytes the most proteins were associated with “cell motility” (GO: 0048870), as well as regulation of cell shape and size, cell morphogenesis, and skin remodeling.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: keratinocytes HaCaT; UVA; 1DE-gel concentration; LC-MS/MS; MaxQuant; cell motility proteins

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100170-5).

Received: 29.05.2024; revised: 05.03.2025; accepted: 31.03.2025.