

УДК 576.385.5

## СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЖАСМОНОВОЙ КИСЛОТОЙ, ВЫЗЫВАЕТ СЕЛЕКТИВНЫЙ ОТВЕТ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ\*

© 2019 М.С. Вильданова<sup>1\*\*</sup>, А.А. Саидова<sup>1</sup>, А.И. Фокин<sup>2</sup>,  
Д.М. Поташникова<sup>1</sup>, Г.Е. Онищенко<sup>1</sup>, Е.А. Смирнова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, 119991 Москва, Россия;  
электронная почта: vch41048@mail.ru

<sup>2</sup> Научно-исследовательский институт физико-химической биологии  
им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2019

После доработки 27.05.2019

Принята к публикации 27.05.2019

Растительные гормоны могут оказывать цитотоксическое воздействие на клетки человека, а также вызывать эффекты, не связанные с гибелью, в частности, индуцировать стресс органелл секреторно-синтетической системы. Целью данной работы являлось исследование возможности активации стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) жасмоновой кислотой (ЖК) и выявление отличий в реакции на действие ЖК культивируемых иммортализованных нетуморогенных клеток человека HaCaT и клеток эпидермоидной карциномы человека A431. Для исследования была использована концентрация ЖК 2 мМ, при которой наблюдалось подавление пролиферации в обеих клеточных линиях. Мы исследовали экспрессию генов, ассоциированных со стрессом ЭПР (*GRP78*, *ATF4*, *CHOP*), структурное состояние ЭПР и комплекса Гольджи, а также синтетические процессы в клетках HaCaT, A431 и показали, что в обеих клеточных линиях ЖК вызывала усиление экспрессии генов стресса ЭПР и гипертрофические изменения комплекса Гольджи. Однако паттерн активации генов, ассоциированных со стрессом ЭПР, в этих клеточных линиях различался, а повышение уровня синтеза инволюкрина наблюдалось только в клетках A431, что может свидетельствовать об активации дифференцировки в данном типе клеток. Следовательно, ЖК индуцирует стресс ЭПР в обеих клеточных линиях, но у иммортализованных нетуморогенных и опухолевых клеток эпидермального происхождения последствия стресса ЭПР носят селективный характер.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** растительные гормоны, жасмоновая кислота, стресс ЭПР, дифференцировка.

DOI: 10.1134/S0320972519090070

Жасмоновая кислота (ЖК) – член семейства жасмонатов, оксипириновых гормонов стресса, продуцируемых клетками водорослей, грибов, мхов, голосеменных и покрытосеменных растений в ответ на абиотический и биотический стрессовые факторы [1, 2]. Показаны селективная цитотоксичность высоких (миллимолярных) концентраций ЖК [3, 4] и ее производных

[5] по отношению ко многим типам опухолевых клеточных линий, а также другие эффекты жасмонатов, не связанные с подавлением жизнеспособности и индукцией клеточной гибели. Так, например, производное жасмонатов – (3-гидрокси-2-пентилциклопентил)-уксусная кислота – индуцировала экспрессию основных протеогликанов кожи и приводила к улучшению за-

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; ЖК – жасмоновая кислота; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; ТЭМ – трансмиссионная электронная микроскопия; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол гидрохлорид (4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride); DMSO – диметилсульфоксид (dimethyl sulfoxide); PI – йодид пропидия; TGN – *транс*-Гольджи-сеть (*trans*-Golgi network); UPR – ответ на несвернутые белки (Unfolded Protein Response).

\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-088, 05.08.2019.

\*\* Адресат для корреспонденции.

живления раны с участием первичных кератиноцитов [6]. Кроме того, жасмонаты могут активировать дифференцировку опухолевых клеток крови человека [7]. Проведенные нами ранее исследования показали, что такие растительные гормоны, как абсцизовая и гиббереллиновая кислоты, вызывают гипертрофические изменения органелл секреторно-синтетической системы культивируемых клеток HaCaT и A431 [8]. Было высказано предположение, что наблюдаемые изменения могут быть связаны с усилением секреторной активности и/или индукцией стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР), который, в свою очередь, может приводить как к гибели, так и к выживанию клеток. Целью данной работы являлось исследование возможности активации стресса ЭПР жасмоновой кислотой и выявление отличий в реакции на действие ЖК культивируемых иммортализованных нетуморогенных клеток человека HaCaT и клеток эпидермоидной карциномы человека A431.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Культивирование клеток.** В качестве объектов исследования были использованы клетки линии HaCaT (иммортализованные нетуморогенные кератиноциты человека, Коллекция клеточных культур для биотехнологических и биомедицинских исследований (общебиологического и биомедицинского направления) Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН) и клетки линии A431 (эпидермоидная карцинома человека, Банк клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки выращивали в среде DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium; «ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (FBS; «ПанЭко», Россия), 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 80 мкг/мл антибиотика гентамицина («Белмедпрепараты», Белоруссия) в стандартных условиях (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>). Клетки отделяли от поверхности пластикового сосуда смесью растворов трипсина («ПанЭко», Россия) и Версена (0,2%-ный раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты в фосфатном буфере; «ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 3, высаживали в 96-луночные планшеты для проведения МТТ-теста или в чашки Петри со стеклами и выращивали в течение 48 ч. Концентрация клеток составляла 100–150 тыс. на 1 мл среды.

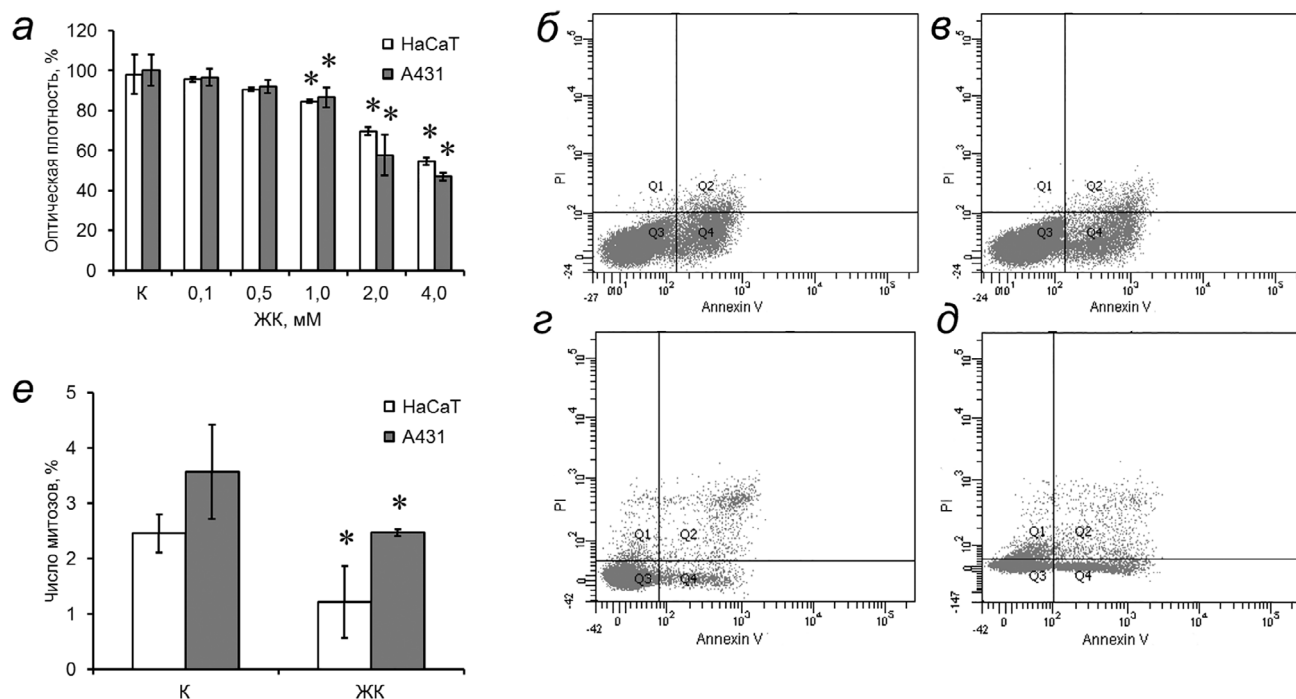
**МТТ-тест.** Для оценки метаболической активности и пролиферации клеток с помощью МТТ-теста через 48 ч после посадки клеток в каждую лунку добавляли раствор ЖК («Sigma-

Aldrich», США) в 96°-ном этиловом спирте, необходимый для достижения требуемой конечной концентрации в среде, и инкубировали в течение 24 ч. В качестве первого контроля служили клетки, культивировавшиеся в стандартных условиях, в качестве второго — клетки, культивировавшиеся в среде с добавлением 96°-ного этилового спирта в объеме, равном объему добавляемого спиртового раствора ЖК. Эксперимент ставили по описанной нами ранее схеме [8]. Разницы между контролем и контролем с добавлением этанола обнаружено не было (данные не приведены), в связи с этим в разделе «Результаты исследования» и на рис. 1 действие ЖК сравнивается только с контролем с добавлением спирта. Аналогично во всех последующих экспериментах ставили два контроля (без добавления спирта и с добавлением спирта в объеме, равном объему раствора ЖК), и в связи с отсутствующей или незначительной разницей между контролем и контролем с добавлением этанола (данные не приведены) далее в разделе «Результаты исследования» и на рис. 2–7 действие ЖК сравнивается только с контролем с добавлением этанола.

**Проточная цитофлуориметрия.** Для выявления популяций апоптотических и некротических клеток использовали набор реактивов Annexin V-FITC Kit PN IM 2375 («Beckman Coulter», Франция). Эксперимент проводили согласно протоколу производителя: клетки, переведенные в суспензию, окрашивали йодидом пропидия (PI) и аннексином V из расчета 2,5 и 5 мкл на 100 мкл суспензии соответственно. Образцы анализировали на проточном сортере FACS Aria SORP («Beckton Dickinson», США).

**ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ).** Последовательности использованных праймеров («Синтол», Россия) приведены в таблице. Эксперимент проводили по описанной ранее схеме [13].

**Трансмиссионная электронная микроскопия.** Клетки фиксировали в течение 30 мин 2,5%-ным глутаровым альдегидом («Ted Pella Inc.», США), промывали PBS (pH 7,2–7,4) и дополнительно контрастировали раствором 1%-ного OsO<sub>4</sub> на PBS (pH 7,2–7,4; «Sigma-Aldrich», США) в течение 1 ч в темноте. Обезвоживание и заключение в эпон 812 («Sigma-Aldrich», США) проводили по стандартной методике. Ультратонкие срезы залитых в эпон образцов окрашивали 1,5%-ным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу. Наблюдения проводили с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1011 («JEOL», Япония) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph GATAN.



**Рис. 1.** Жизнеспособность клеток HaCaT и A431 при воздействии жасмоновой кислотой (ЖК). К – контроль. *a* – Оптическая плотность после инкубации с ЖК (0,1–4,0 мМ); *б–д* – клеточная гибель в культурах HaCaT (*б, в*) и A431 (*с, д*) без воздействия и при воздействии 2 мМ ЖК (приведены репрезентативные данные по трем (A431) и пяти (HaCaT) экспериментам; Q1 – клетки, положительные по PI (некротические, клеточный дебрис); Q2 – клетки, положительные по Annexin V и PI (на поздних стадиях гибели – постапоптотический некроз, вторичный некроз); Q3 – клетки, отрицательные по Annexin V и PI (живые клетки); Q4 – клетки, положительные по Annexin V (апоптотические клетки); *е* – митотический индекс в клетках HaCaT и A431 при воздействии ЖК. Приведены средние значения ( $n = 3..6$ ) и их стандартные отклонения; \*  $p \leq 0,01$  по критерию Манна–Уитни

**Иммуноцитохимия.** Для проведения иммуноцитохимического окрашивания клетки инкубировали в чашках Петри со стеклами в присутствии ЖК в концентрации 2 мМ в течение 24 ч, а затем фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида («MP Biochemical», Франция) в PBS (pH 7,2–7,4) и обрабатывали 0,1%-ным Triton X-100 («Serva», Германия). Для визуализации клеточных органелл использовали моноклональные антитела мыши к белку аппарата Гольджи 58K (formiminotransferase cyclodeaminase, FTCD; «Sigma-Aldrich», США); моноклональные антитела мыши к инволюкрину («Sigma-Aldrich», США); антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 488 («Thermo Fisher Scientific», США). Для визуализации ядер и митотических фигур использовали краситель DAPI («Sigma-Aldrich», США). Препараты заключали в мовиол («Hoechst», Германия). Съемку препаратов проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M («Carl Zeiss Inc.», Германия; объективы PlanApo 20× и 63×/1,4 oil), снабженного черно-белой цифровой камерой Carl Zeiss AxioCam и программным обеспечением AxioVision 3.1 («Carl Zeiss Inc.», Германия); микроскопа Nikon

Eclipse Ti-E («Nikon», Япония) с конфокальным модулем A1 и объективом Apo TIRF 60×/1,49 oil.  
**Белковый электрофорез и иммуноблоттинг.** Клетки лизировали в 2× лизирующем буфере,

Последовательности олигонуклеотидных праймеров для амплификации генов методом ПЦР-РВ

Мишень	Праймеры	Ссылка
<i>CHOP</i>	5'-AGTCTAAGGCACTGAGCGTATC-3' 5'-TCTGTTTCCGTTTCTGTT-3'	[9]
<i>GRP78</i>	5'-TCTGCTTGATGTGTGTCCTCTT-3' 5'-GTCGTTACCTTCGTAGACCT-3'	[10]
<i>ATF4</i>	5'-TGGCTGGCTGTGGATGG-3' 5'-TCCCGGAGAAGGCATCCT-3'	[11]
<i>UBC</i>	5'-ATTGGGTCGCGGTTCTTG-3' 5'-TGCCTTGACATTCTCGATGGT-3'	[12]
<i>HPRT</i>	5'-TGACACTGGCAAAACAATGCA-3' 5'-GGTCTTTTACCAGCAAGCT-3'	[12]
<i>GAPDH</i>	5'-TGCACCACAACCTGCTTAGC-3' 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	[12]
<i>YWHAZ</i>	5'-ACTTTTGGTACATTGTGGCTTCAA-3' 5'-CCGCCAGGACAAACCAGTAT-3'	[12]

содержавшем 200 мМ Tris-HCl, 400 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола («Bio-Rad», США), 4% додецилсульфата натрия (SDS; «Serva», Германия), 0,01% бромфенолового синего и 40% глицерина («PanReac», Испания). Полученный лизат инкубировали при 100 °С в течение 10 мин. Электрофоретическое разделение белков проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-Protean Tetra Vertical Electrophoresis Cell («Bio-Rad», США). Использовали нижний 10%-ный разделяющий ПААГ (акриламид : N,N'-метиленбисакриламид в соотношении 30 : 0,8; «Bio-Rad», США), верхний 4%-ный концентрирующий ПААГ («Bio-Rad», США) и Tris-глициновый электродный буфер, pH 8,3 («Bio-Rad», США). Для контроля разделения наносили белковый маркер PageRuler Plus Prestained 10–250 kDa Protein Ladder («Thermo Fisher Scientific», США). Электрофоретическое разделение белков проводили в TGB-буфере («Bio-Rad», США) при следующих характеристиках электрического поля: в концентрирующем геле – сила тока 20 мА, в разделяющем геле – сила тока 30 мА при напряжении 210 В.

Полусухой перенос белков на мембрану PVDF («GE Healthcare», США) осуществляли в камере для переноса белков Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell («Bio-Rad», США), заполненной буфером для переноса белков, содержащим 47,9 мМ Tris-base, 38,6 мМ глицина, 0,0385% SDS, 20% метанола. Перенос проходил при напряжении 100 В и силе тока 100 мА в течение 30 мин. Затем мембрану PVDF инкубировали в 2%-ном BSA («Sigma-Aldrich», США), разведенном в PBS, в течение 30 мин. Далее в раствор вносили антитела, разведенные в PBS: антитела к инволюкрину добавляли до разведения 1 : 2000, антитела к  $\beta$ -актину, конъюгированные с пероксидазой хрена («Abcam», Великобритания), – до разведения 1 : 50 000; инкубацию с антителами проводили в течение 18 ч. Мембрану промывали в буфере PBST (PBS и 0,1%-ный Tween 20; «Helicon», Россия). Вторичные антитела кролика к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, разводили в PBST (1 : 10 000) и инкубировали в течение 1,5 ч, после чего снова промывали в PBST. Для выявления окрашивания использовали систему Amersham ECL Prime («GE Healthcare», США), основанную на детекции излучения, обусловленного окислением люминола, катализируемым пероксидазой, и систему гель-документирования ChemiDoc MP System («Bio-Rad», США).

**Оценка интенсивности общего белкового синтеза.** Эксперимент ставили с использованием набора реактивов Click-iT ANA Alexa Fluor 488

Protein Synthesis HCS Assay («Thermo Fisher Scientific», США) по описанной нами ранее схеме [8]. В качестве контроля для ингибирования синтеза белка использовали обработку циклогексимидом («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1,5 мМ в течение 1,5 ч.

**Обработка данных.** Обработку и коррекцию полученных изображений проводили в программе ImageJ (National Institutes of Health, США). Для оценки интенсивности белкового синтеза использовали плагин, написанный д.б.н. И.И. Киреевым (лаборатория электронной микроскопии, НИИФХБ им. А.Н. Белозерского). Для статистической обработки данных в контроле и в опытной группе был использован *U*-критерий Манна–Уитни (непараметрический). Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Определение действующей концентрации ЖК.** Исследование влияния ЖК в концентрациях 0,1–4,0 мМ (время инкубации 24 ч) на метаболическую активность клеток HaCaT и A431 было проведено с помощью МТТ-теста. Установлено, что при концентрациях 1, 2 и 4 мМ наблюдалось снижение оптической плотности раствора формазана в клетках HaCaT – на 17, 30 и 45% и клетках A431 – на 15, 43 и 53% соответственно (рис. 1, *a*). При более низких концентрациях ЖК в обеих клеточных линиях достоверных отличий выявлено не было. Следовательно, клетки HaCaT и A431 на действие ЖК в концентрации от 1 мМ и выше реагируют сходным образом, но при концентрациях 2 и 4 мМ снижение метаболической активности было более выраженным у опухолевых клеток.

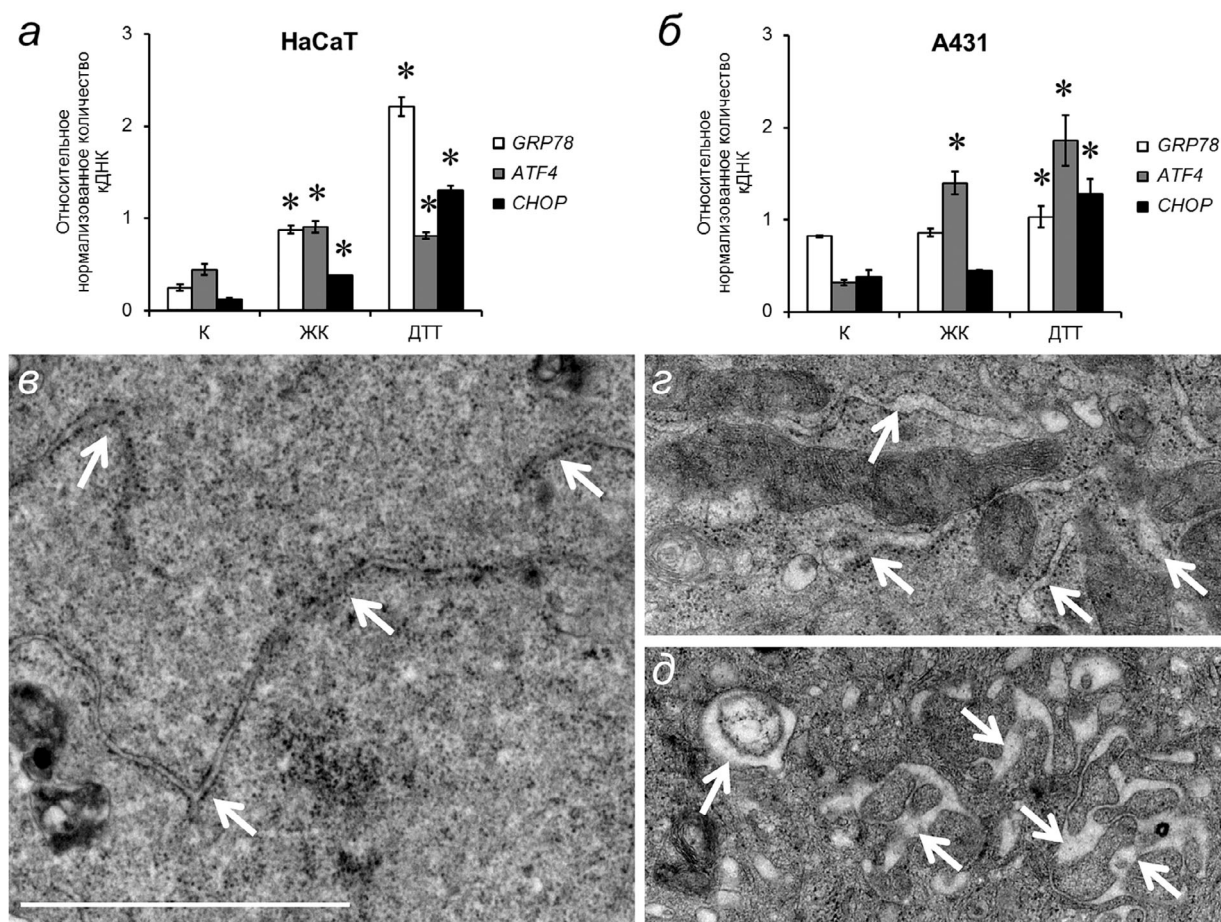
Снижение метаболической активности, выявляемое с помощью МТТ-теста, может быть связано как с активацией клеточной гибели, так и с подавлением пролиферации. Поэтому мы исследовали клеточную гибель при воздействии 2 мМ ЖК методом проточной цитофлуориметрии при мечении аннексином V и йодидом пропидия (PI) (рис. 1, *b–d*). В контрольных клетках HaCaT количество живых клеток (не окрашенных аннексином V и PI) составляло 89,3%; клеток, меченных аннексином V, – 9,3%; клеток, меченных PI, – 0,1%; клеток, имеющих обе метки, – 1,3% (рис. 1, *b*). При действии ЖК в клеточной популяции HaCaT эти процентные соотношения практически не изменяются (8,4; 0,1 и 1,2% соответственно; рис. 1, *e*). В контрольных клетках A431 количество живых клеток составляло 94,4%; клеток, меченных аннексином V, –

2,3%, клеток, меченных PI, – 1% и клеток, имеющих обе метки, – 2,3% (рис. 1, *з*). После инкубации с ЖК количество живых клеток A431 составляло 89,7%; клеток, меченных аннексином V, – 5,5%; клеток, меченных PI, – 2,4%; клеток, имеющих обе метки, – 2,4% (рис. 1, *д*). Поэтому снижение метаболической активности, выявленное с помощью МТТ-теста в обеих клеточных линиях, вероятнее всего, связано с подавлением пролиферации.

Подсчет числа митотических клеток показал, что в контрольной популяции клеток HaCaT было 2,45% митозов, а при инкубации с ЖК – 1,21% митозов (рис. 1, *е*). В клетках A431 число митозов составляло 3,57% и снижалось при действии ЖК до 2,47% (рис. 1, *е*). Следовательно, ЖК в концентрации 2 мМ индуцирует подавление пролиферации в 2 раза в клетках HaCaT и в 1,4 раза в клетках A431.

Таким образом, МТТ-тест, проточная цитофлуориметрия и подсчет митотического индекса показали, что при концентрации 2 мМ ЖК снижение жизнеспособности не связано с массовой гибелью клеток. Данная концентрация была использована для исследования влияния ЖК на секреторно-синтетическую систему.

**Детекция стресса ЭПР.** С помощью ПЦР-РВ мы исследовали уровень экспрессии мРНК генов, ассоциированных со стрессом ЭПР: *GRP78* (binding immunoglobulin protein/78-kDa glucose-regulated protein), *ATF4* (activating transcription factor 4) и *CHOP* (C/EBP homologous protein). В качестве положительного контроля был использован ДТТ – активатор стресса ЭПР. В клетках HaCaT ДТТ стимулировал усиление экспрессии всех изученных генов, и наиболее значительное повышение наблюдалось для генов *GRP78* и *CHOP* (рис. 2, *а*). ЖК также повышала уровень



**Рис. 2.** Активация стресса ЭПР в клетках HaCaT и A431 при воздействии жасмоновой кислотой (ЖК). *а, б* – Уровень экспрессии мРНК генов *GRP78*, *ATF4* и *CHOP*, ассоциированных с активацией стресса ЭПР, в клетках HaCaT и A431 при воздействии ЖК. К – контроль, ДТТ – дитиотреитол. Приведены средние значения, полученные по трем повторностям в двух независимых экспериментах, и их стандартные отклонения; \*  $p \leq 0,01$  по критерию Манна–Уитни; *в–д* – ЭПР в клетках HaCaT при воздействии ЖК: *в* – контроль, *з* и *д* – ЖК; *в–д* – ТЭМ, стрелки указывают на цистерны ЭПР, масштабный отрезок – 2 мкм

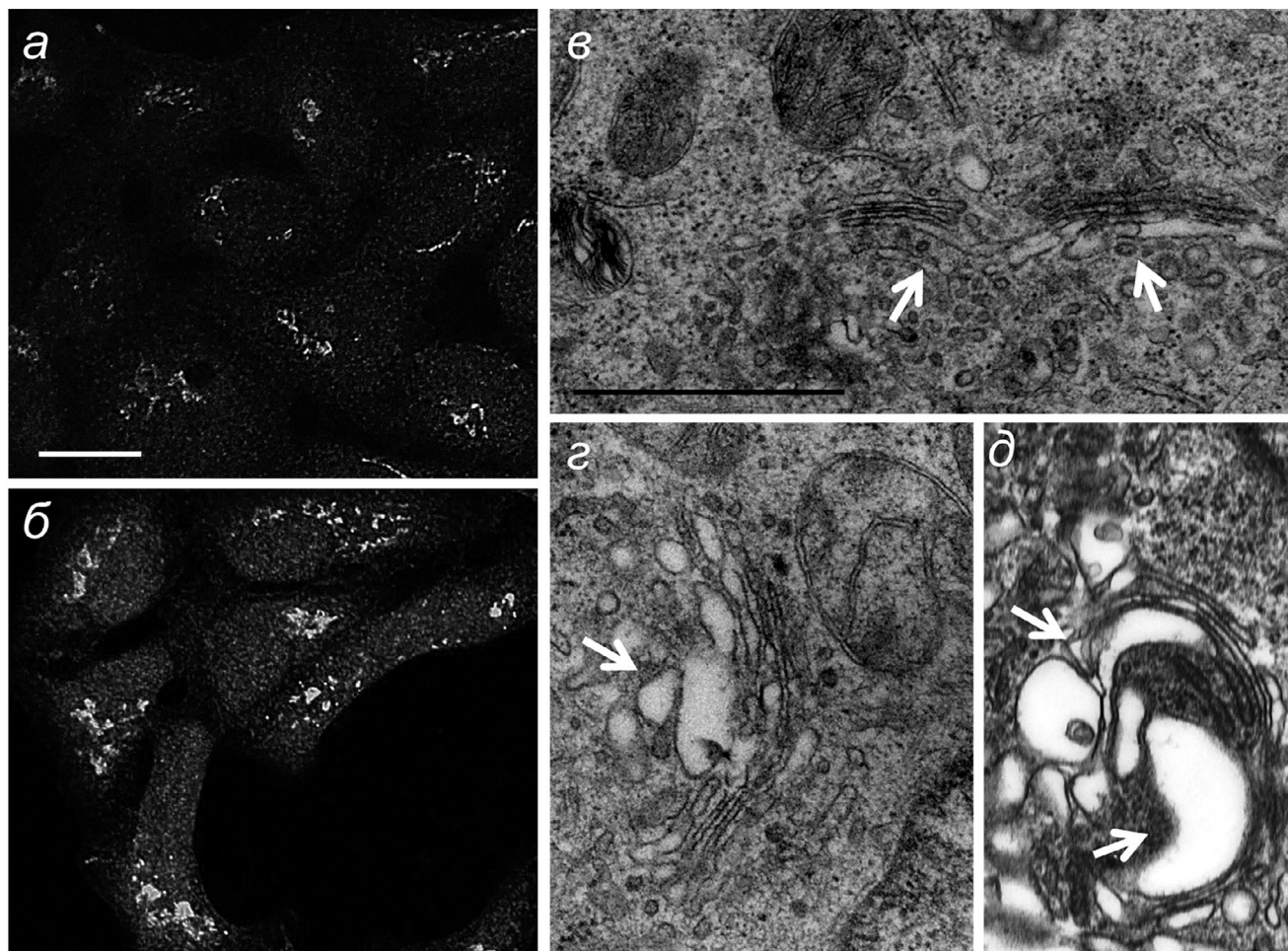
экспрессии всех изученных генов в данных клетках, однако это повышение было менее выраженным, чем при действии ДТТ для *GRP78* и *CHOP* (рис. 2, *а*). В клетках А431 ДТТ стимулировал усиление экспрессии генов *ATF4* и *CHOP*, в то время как для *GRP78* активация была на низком уровне (рис. 2, *б*). При действии ЖК было выявлено значительное усиление экспрессии только для *ATF4* (сравнимое с тем, которое наблюдалось при действии ДТТ), а для *GRP78* и *CHOP* уровень экспрессии оставался на уровне контрольных клеток (рис. 2, *б*).

Таким образом, анализ экспрессии генов, активируемых при стрессе ЭПР, показал, что ЖК индуцирует стресс ЭПР в обеих клеточных линиях, но пути индукции носят разный характер. Поскольку одним из морфологических критериев стресса ЭПР может быть набухание и расширение цистерн ЭПР [14, 15], мы исследовали состояние цистерн ЭПР при действии ЖК

с помощью трансмиссионной электронной микроскопии.

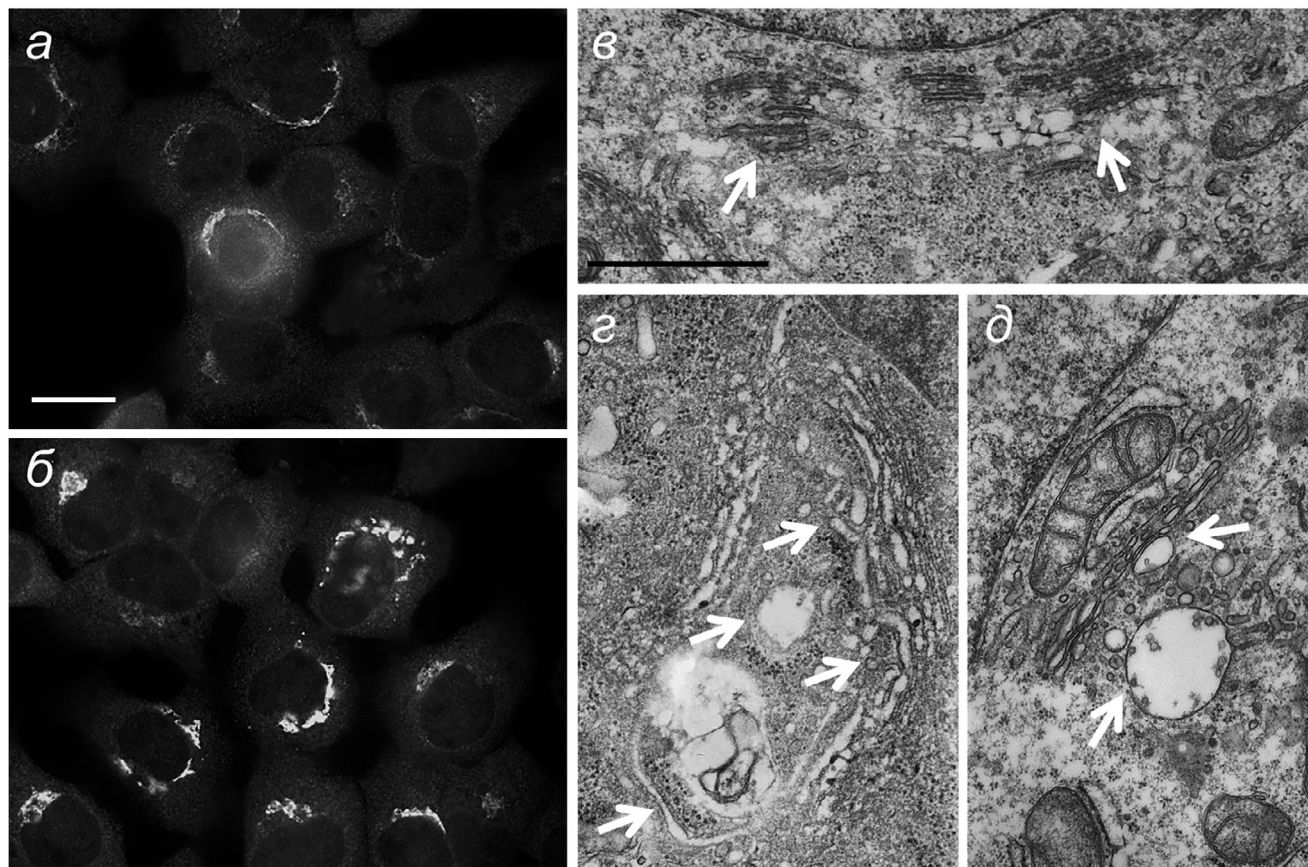
**Структурное состояние ЭПР.** Исследование ультраструктуры ЭПР в клетках НаСаГ и А431 при действии ЖК показало, что по сравнению с контролем увеличение объема цистерн ЭПР наблюдается только в клетках НаСаГ (рис. 2, *в–д*), в то время как в клетках А431 таких признаков выявлено не было (данные не приведены). Следовательно, такие морфологические признаки стресса ЭПР, как набухание цистерн, проявляются только в иммортализованных кератиноцитах.

**Структурное состояние комплекса Гольджи.** Далее мы исследовали состояние следующего компартмента секреторно-синтетической системы клеток, связанного с ЭПР, – комплекса Гольджи. Иммуноцитохимическое выявление комплекса Гольджи с помощью антител к белку р58К показало, что после инкубации с ЖК в



**Рис. 3.** Комплекс Гольджи в клетках НаСаГ при воздействии жасмоновой кислотой (ЖК): *а, в* – контроль; *б, з, д* – обработка ЖК; *а, б* – иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к белку 58К; масштабный отрезок – 10 мкм; *в–д* – ТЭМ, стрелки указывают на *транс*-часть аппарата Гольджи и TGN; масштабный отрезок – 1 мкм





**Рис. 4.** Комплекс Гольджи в клетках А431 при воздействии жасмоновой кислотой (ЖК): *а, в* – контроль; *б, з, д* – обработка ЖК; *а, б* – иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к белку 58К, масштабный отрезок – 10 мкм; *в–д* – ТЭМ, стрелки указывают на *транс*-часть аппарата Гольджи и TGN, масштабный отрезок – 1 мкм

клетках HaCaT (рис. 3, *а, б*) и в клетках А431 (рис. 4, *а, б*) происходило набухание комплекса Гольджи, что может быть связано как с гипертрофическими изменениями всего комплекса, так и его отдельных компартментов. Далее было проведено исследование с помощью электронной микроскопии, которое продемонстрировало, что комплекс Гольджи в клетках HaCaT и А431 был представлен в виде близко расположенных стопок, имеющих характерную полярность (рис. 3, *в*; рис. 4, *в*). Стопки располагались в околядерной области. После инкубации с ЖК в клетках обеих линий цистерны *транс*-части стопок были расширенными, а TGN-компаратмент представлен гетерогенными по размеру, но достаточно крупными везикулами (рис. 3, *з, д*; рис. 4, *з, д*).

Полученные результаты указывают на то, что при действии ЖК наблюдаются гипертрофические изменения комплекса Гольджи в обеих клеточных линиях, что наряду с данными о расширении цистерн ЭПР в клетках HaCaT может свидетельствовать о протекании процессов, ассоциированных со стрессом ЭПР.

Стресс ЭПР приводит к различным последствиям, способствующим выживанию или гибели клеток; в физиологических условиях он может запускать дифференцировку [16], в т.ч. кератиноцитов [17]. Поэтому далее мы исследовали уровень синтеза маркера дифференцировки кератиноцитов инволюкрина в клетках HaCaT и А431 при действии ЖК.

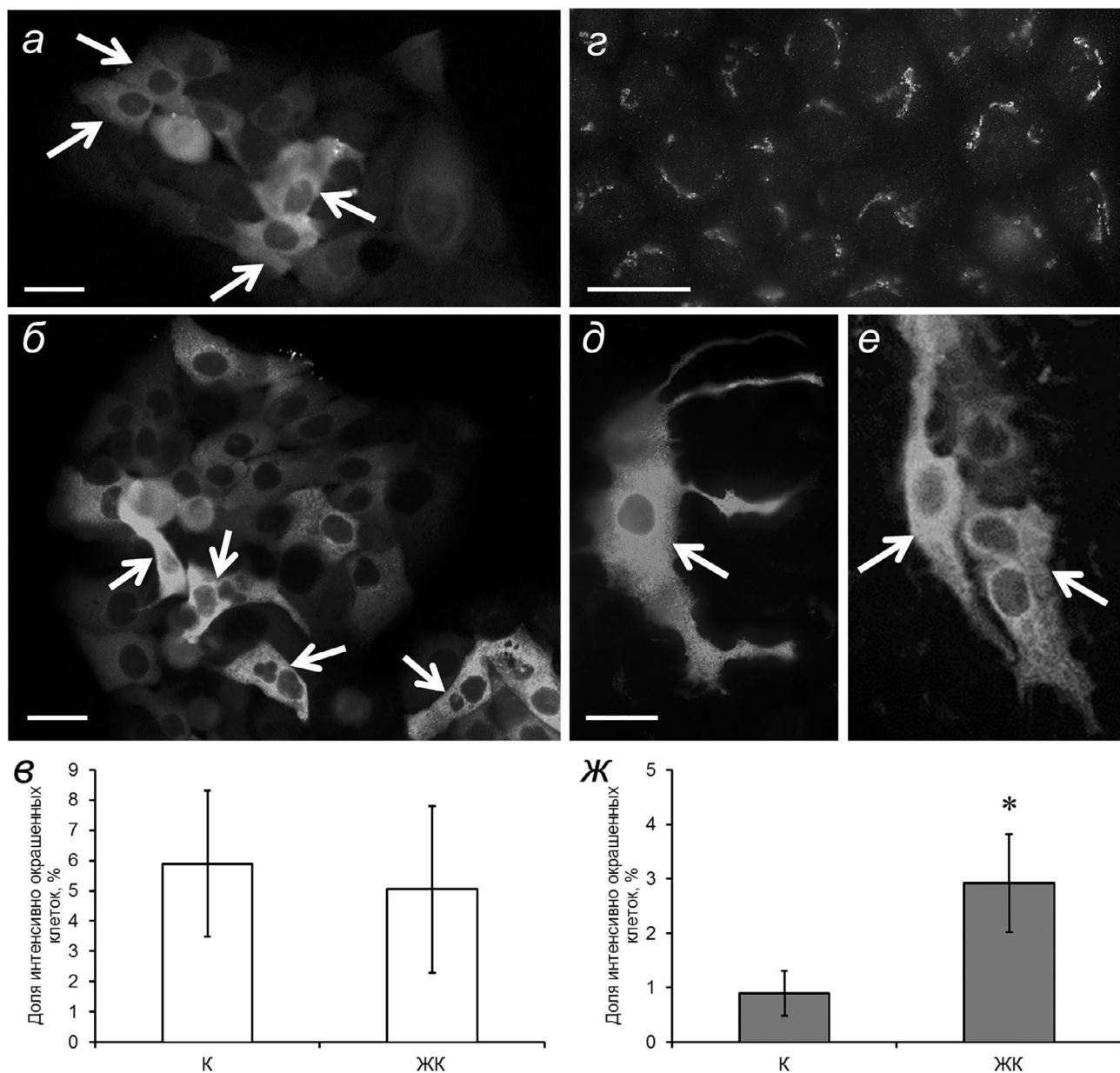
**Уровень синтеза инволюкрина.** При иммуноцитохимическом окрашивании с использованием антител к инволюкрину в клетках линии HaCaT было обнаружено слабое диффузное окрашивание цитоплазмы. Определенные клетки, преимущественно собранные в островки или единичные отростчатые клетки, значительно отличались по яркости окрашивания цитоплазмы (рис. 5, *а, б*, отмечено стрелками). Подсчет числа таких ярко окрашенных клеток показал, что их количество не превышало 6% (рис. 5, *в*). После действия ЖК характер окрашивания клеточной популяции не менялся (рис. 5, *б*).

Имуноцитохимическое окрашивание с использованием антител к инволюкрину клеток

A431 показало, что на фоне слабого диффузного окрашивания цитоплазмы выявлялись структуры, по морфологии соответствующие комплексу Гольджи (рис. 5, *з*). В то же время не более чем в 1% от всей клеточной популяции наблюдалось яркое диффузное окрашивание цитоплазмы, как в клетках HaCaT (рис. 5, *д, е*; отмечено стрелками). Такие клетки часто формировали островки, которые располагались поверх кле-

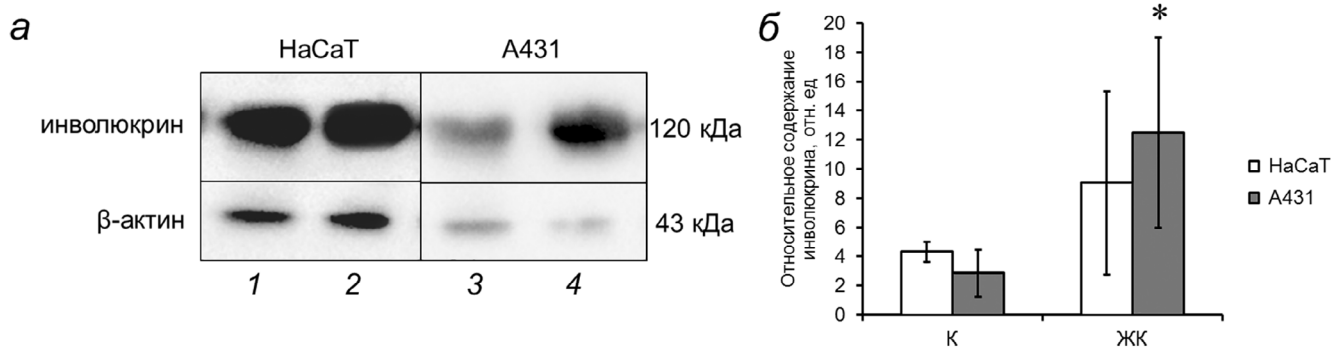
ток, прикрепленных к субстрату (рис. 5, *е*). При действии ЖК мы наблюдали увеличение числа таких клеток до 3% (рис. 5, *ж*).

Далее с помощью вестерн-блоттинга мы провели исследование уровня содержания инволюкрина в лизатах клеток HaCaT и A431 до и после инкубации с ЖК. Как показано на рис. 6, ЖК не оказывала влияния на уровень синтеза инволюкрина в клетках HaCaT, в то время как в



**Рис. 5.** Инволюкрин в клетках HaCaT и A431 при воздействии жасмоновой кислотой (ЖК): *а–в* – HaCaT; *з–ж* – A431; *а, в* – контроль; *б, д, е* – ЖК; *а, б, з–е* – иммуноцитохимическое окрашивание клеток антителами к инволюкрину, стрелки указывают на клетки с ярким диффузным окрашиванием (островки или одиночные клетки с отростками), масштабный отрезок – 10 мкм; *в* – доля клеток HaCaT с ярким диффузным окрашиванием антителами к инволюкрину; *ж* – доля клеток A431 с ярким диффузным окрашиванием антителами к инволюкрину. Приведены средние значения ( $n = 3$ ) и их стандартные отклонения; \*  $p \leq 0,01$  по критерию Манна–Уитни





**Рис. 6.** Содержание инволюкрина в клетках NaCaT и A431. *a* – Содержание инволюкрина; 1, 3 – контроль; 2, 4 – ЖК; *б* – относительное содержание инволюкрина; приведены средние значения ( $n = 3...4$ ) и их стандартные отклонения; \*  $p \leq 0,01$  по критерию Манна–Уитни

клетках A431 после инкубации с ЖК содержание инволюкрина возросло в 2,7 раза.

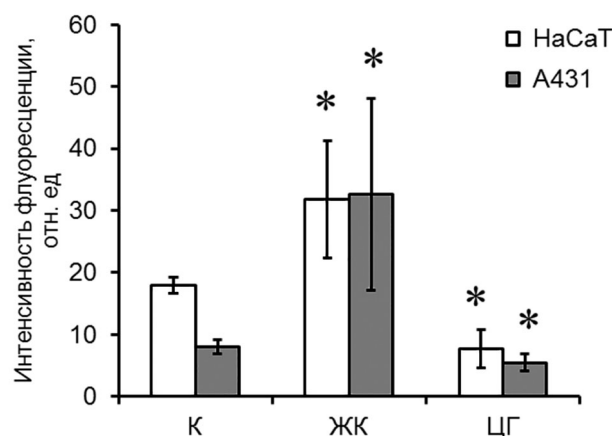
Повышение содержания маркера дифференцировки, выявленное в опухолевых клетках, может вносить вклад в синтетическую активность клеток. В связи с этим следующим этапом работы стало исследование уровня общего белкового синтеза в клетках NaCaT и A431.

**Определение уровня общего белкового синтеза.** Для того чтобы выяснить, влияет ли ЖК на биосинтетические процессы в клетках, мы провели сравнение уровня общего белкового синтеза в контрольных клетках, при действии 1,5 мМ ингибитора белкового синтеза циклогексимида (ЦГ) и 2 мМ ЖК. Полученные данные указывают на то, что после инкубации с ЖК интенсивность флуоресценции, а следовательно, и интенсивность белкового синтеза, в клетках NaCaT повышалась в 1,8 раза, а в клетках A431 – в 4 раза (рис. 7). Сходные данные были получены нами ранее и для другого растительного гормона (абсцизовой кислоты) в клетках A431 [8].

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что ЖК стимулирует подавление пролиферации в клетках обеих линий, а также активацию генов *GRP78*, *ATF4* и *CHOP* в клетках NaCaT и гена *ATF4* в клетках A431. Белок *GRP78* – шаперон люмена ЭПР, который в норме инактивирует трансмембранные рецепторы ЭПР – киназы *PERK* (PKR-like eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$  kinase), *IRE1* (inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ ) и транскрипционный фактор *ATF6* (activating transcription factor 6). Стресс ЭПР, связанный с накоплением неправильно уложенных белков в его люмене, активирует эволюционно-консер-

вативный ответ UPR (Unfolded Protein Response), в ходе которого происходят подавление трансляции и одновременно дополнительная активация синтеза шаперонов, включая *GRP78*, помогающая эукариотическим клеткам восстанавливать баланс сворачивания в ЭПР [17, 18]. При активации стресса ЭПР и UPR *GRP78* отделяется от белков *PERK*, *ATF6*, *IRE1*, которые, в свою очередь, активируют ряд транскрипционных факторов, в т.ч. компоненты *PERK*-пути – *ATF4* и *CHOP*. Индуктор стресса ЭПР ДТТ, использованный в данной работе в качестве положительного контроля, повышал уровень фосфорилированного *eIF2 $\alpha$*  – компонента *PERK*-пути UPR, который может приводить как к адаптации клеток после стресса, так и к развитию апоптоза [19]. Поскольку ни в одном



**Рис. 7.** Интенсивность общего белкового синтеза в клетках NaCaT и A431 при действии ЖК; К – контроль, ЦГ – циклогексимид. Приведены средние значения ( $n = 3...6$ ) и их стандартные отклонения; \*  $p \leq 0,01$  по критерию Манна–Уитни. Фоновое свечение клеток при действии циклогексимида обусловлено отсутствием его влияния на белковый синтез в митохондриях

типе клеток не наблюдалось значительной клеточной гибели, вероятно, ответ на вызванный ЖК стресс ЭПР в обеих клеточных линиях является адаптивным.

Стресс ЭПР на морфологическом уровне в некоторых случаях сопровождается гипертрофией цистерн ЭПР, что было показано в данной работе для клеток HaCaT. Можно предположить, что расширение *транс*-части комплекса Гольджи в обоих типах клеток также является его следствием. Белковый поток связывает между собой ЭПР и комплекс Гольджи, следовательно, подавление трансляции и накопление неправильно свернутых белков при стрессе ЭПР может приводить к изменениям в комплексе Гольджи, в т.ч. проявляющимся на ультраструктурном уровне. Возможно, что этим объясняется расширение цистерн *транс*-части комплекса Гольджи, наблюдаемое в обоих типах клеток. С другой стороны, не исключено, что подобные морфологические изменения в ультраструктуре комплекса Гольджи могут быть связаны с усилением секреторной активности клеток (в пользу чего свидетельствуют данные об усилении интенсивности общего белкового синтеза как в клетках HaCaT, так и в A431, и усилении экспрессии шаперона GRP78 в клетках HaCaT) или повышением продукции органелл эндосомно-лизосомного компартмента.

В то же время были выявлены отличия в реакции клеток HaCaT и A431 на действие ЖК. В клетках A431 индуцированный ЖК стресс ЭПР сопровождается повышением уровня синтеза инволюкрина — маркера дифференцировки кератиноцитов. Физиологический стресс ЭПР в кератиноцитах поддерживает гомеостаз эпидермального барьера и приводит к терминальной дифференцировке [17, 20], в ходе которой клетки проходят процессы замены внутриклеточного содержимого белками цитоскелета (кератин 1, 2, 10) и сшивки белков (инволюкрин, лорикрин и др.) на периферии клеток для формирования водонепроницаемой оболочки [21]. Инволюкрин синтезируется в цитозоле, но затем прикрепляется к белкам плазматической мембраны с помощью трансглутаминазы [22, 23]. В ходе нашей работы с помощью иммуноцитохимического окрашивания мы показали, что в клетках HaCaT и A431 локализация инволюкрина значительно различается: в линии HaCaT диффузно окрашены все клетки (что, по всей видимости, отражает нормальное расположение белка под плазматической мембраной), тогда как в линии A431 диффузное окрашивание имеет лишь малая часть популяции, а в остальных клетках инволюкрин выявляется в связи со структурами в цитоплазме, по морфологии соответствующими аппарату

Гольджи (что, возможно, обусловлено связыванием инволюкрина с отходящими от *транс*-части аппарата Гольджи везикулами). Это объясняется тем, что в отличие от клеток HaCaT в клетках A431 понижена активность трансглутаминазы, осуществляющей связывание инволюкрина с белками плазматической мембраны, в связи с чем эти клетки не достигают стадии терминальной дифференцировки даже в условиях, способствующих данному процессу (повышенный уровень  $Ca^{2+}$ ) [22]. Кроме того, после инкубации с ЖК достоверно увеличивается число клеток линии A431 с диффузным, т.е. нормальным, окрашиванием, что свидетельствует о нормализации фенотипа патологически измененных клеток. Возможно, это связано с усилением синтеза инволюкрина и/или усилением активности трансглутаминазы. Данные вестерн-блоттинга подтверждают тот факт, что ЖК повышает уровень содержания инволюкрина в опухолевых клетках, и, вероятно, этот процесс вносит вклад в усиление белкового синтеза, регистрируемое в этих клетках. Ранее Rosdy et al. показали, что эпидермальный фактор роста усиливает накопление инволюкрина в клетках A431 и вместе с этим подавляет их пролиферацию [22]. Подобные эффекты продемонстрированы и для вещества тербинафин (действующий компонент известного лекарственного препарата «Ламизил»): в клетках A431 тербинафин вызывает дифференцировку, связанную с экспрессией инволюкрина и сопровождающуюся блокировкой клеточного цикла [24].

Существует широкий спектр структурно разнообразных агентов ( $Ca^{2+}$ , форболовый эфир, омега-6 жирная кислота, полифенолы зеленого чая), которые активируют экспрессию генов инволюкрина в эпителии по сходному механизму — путем взаимодействия с каскадом MAPK (mitogen-activated protein kinases) [25]. MAPK — серин/треониновые киназы, играющие ключевую роль в передаче сигнала от клеточной поверхности к ядру; у млекопитающих они подразделяются на ERK (extra-cellular signal regulated protein kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) и p38 MAPK [23]. Вышеупомянутый механизм экспрессии генов инволюкрина в эпителии заключается в усилении активности p38 и уменьшении активности ERK1/2 [25]. Показано, что в результате активации MAP-киназного пути под действием метилжасмоната происходит индукция дифференцировки клеток миелоидной лейкемии человека HL-60 в моноциты и гранулоциты [26], а также активация MAP-киназ JNK и p38 в клетках Т-лимфобластной лейкемии человека Molt-4 и лимфоцитах периферической крови человека [27]. Интересно, что ДТТ также мо-

жет активировать JNK и p38 через IRE1 $\alpha$ -путь [28] и PERK-путь стресса ЭПР [29]. Возможно, что показанное нами подавление пролиферации под действием ЖК в обеих клеточных линиях, а также дифференцировка в клетках A431 могут происходить через активацию пути PERK–ATF4.

Таким образом, мы выявили общие признаки реакции иммортализованных кератиноцитов и опухолевых клеток человека на действие ЖК (стресс ЭПР, гипертрофия аппарата Гольджи, усиление белкового синтеза) и признак, характерный только для клеток A431 (повышение содержания инволюкрина), что, по всей видимости, обусловлено разницей в паттернах экспрессии генов-маркеров стресса ЭПР, приводящей к различным последствиям. Полученные данные свидетельствуют о селективности действия ЖК на опухолевые клетки и могут быть использова-

ны в дальнейших исследованиях, направленных на изучение влияния растительных гормонов на клетки животных и человека, включая разработку подходов к противоопухолевой терапии, связанных с дифференцировкой опухолей эпидермального происхождения.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00233) и Программы развития МГУ (комплекс FACSAGia SORP).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wasternack, C., and Hause, B. (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*, **111**, 1021–1058, doi: 10.1093/aob/mct067.
2. Song, S., Qi, T., Wasternack, C., and Xie, D. (2014) Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene, *Curr. Opin. Plant Biol.*, **21**, 112–119, doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.005.
3. Fingrut, O., and Flescher, E. (2002) Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells, *Leukemia*, **16**, 608–616, doi: 10.1038/sj.leu.2402419.
4. Rotem, R., Heyfets, A., Fingrut, O., Blickstein, D., Shaklai, M., and Flescher, E. (2005) Jasmonates: novel anticancer agents acting directly and selectively on human cancer cell mitochondria, *Cancer Res.*, **65**, 1984–1993, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3091.
5. Li, J., Chen, K., Wang, F., Dai, W., Li, S., Feng, J., Wu, L., Liu, T., Xu, S., Xia, Y., Lu, J., Zhou, Y., Xu, L., and Guo, C. (2017) Methyl jasmonate leads to necrosis and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells via inhibition of glycolysis and represses tumor growth in mice, *Oncotarget*, **8**, 45965–45980, doi: 10.18632/oncotarget.17469.
6. Henriot, E., Jager, S., Tran, C., Bastien, P., Michelet, J.F., Minondo, A.M., Formanek, F., Dalko-Csiba, M., Lortat-Jacob, H., Breton, L., and Vives, R.R. (2017) A jasmonic acid derivative improves skin healing and induces changes in proteoglycan expression and glycosaminoglycan structure, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1861**, 2250–2260, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.006.
7. Tsumura, H., Akimoto, M., Kiyota, H., Ishii, Y., Ishikura, H., and Honma, Y. (2009) Gene expression profiles in differentiating leukemia cells induced by methyl jasmonate are similar to those of cytokinins and methyl jasmonate analogs induce the differentiation of human leukemia cells in primary culture, *Leukemia*, **23**, 753–760, doi: 10.1038/leu.2008.347.
8. Вильданова М.С., Савицкая М.А., Онищенко Г.Е., Смирнова Е.А. (2014) Действие растительных гормонов на компоненты секреторного пути нормальных и опухолевых клеток человека, *Цитология*, **56**, 516–525.
9. Fu, J., Zhao, L., Wang, L., and Zhu, X. (2015) Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia, *Taiwan J. Obstet. Gynecol.*, **54**, 19–23, doi: 10.1016/j.tjog.2014.11.002.
10. Murugan, D., Lau, Y.S., Lau, C.W., Mustafa, M.R., and Huang, Y. (2015) Angiotensin 1-7 protects against angiotensin II-induced endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction via Mas receptor, *PLoS One*, **10**, e0145413, doi: 10.1371/journal.pone.0145413.
11. Plaisance, V., Brajkovic, S., Tenenbaum, M., Favre, D., Ezanno, H., Bonnefond, A., Bonner, C., Gmyr, V., Kerr-Conte, J., Gauthier, B.R., Widmann, C., Waeber, G., Pattou, F., Froguel, P., and Abderrahmani, A. (2016) Endoplasmic reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic  $\beta$ -cell function caused by human oxidized LDL, *PLoS One*, **11**, e0163046, doi: 10.1371/journal.pone.0163046.
12. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
13. Potashnikova, D., Gladkikh, A., and Vorobjev, I.A. (2015) Selection of superior reference genes' combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **45**, 64–72.
14. Mishra, A.R., Zheng, J., Tang, X., and Goering, P.L. (2016) Silver nanoparticle-induced autophagic-lysosomal disruption and NLRP3-Inflammasome activation in HepG2 cells is size-dependent, *Toxicol. Sci.*, **150**, 473–487, doi: 10.1093/toxsci/kfw011.
15. Smith, M., and Wilkinson, S. (2017) ER homeostasis and autophagy, *Essays Biochem.*, **61**, 625–635, doi: 10.1042/EBC20170092.
16. Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Taniguchi, M., Shingaki, K., Kubo, T., Kiya, K., Fujiwara, T., Kanazawa, S., Kanematsu, R., Maeda, T., Takamura, H., Yamada, K., Miyoshi, K., Hosokawa, K., Tohyama, M., and Katayama, T. (2015) Physiological ER stress mediates the differentiation of fibroblasts, *PLoS One*, **10**, e0123578, doi: 10.1371/journal.pone.0123578.

17. Sugiura, K. (2013) Unfolded protein response in keratinocytes: impact on normal and abnormal keratinization, *J. Dermatol. Sci.*, **69**, 181–186, doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.12.002.
18. Chakrabarti, A., Chen, A.W., and Varner, J.D. (2011) A review of the mammalian unfolded protein response, *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 2777–2793, doi: 10.1002/bit.23282.
19. Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J.A., and Majsterek, I. (2016) The role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP signaling pathway in tumor progression during endoplasmic reticulum stress, *Curr. Mol. Med.*, **16**, 533–544.
20. Celli, A., Mackenzie, D.S., Crumrine, D.S., Tu, C.L., Hupe, M., Bikle, D.D., Elias, P.M., and Mauro, T.M. (2011) Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion activates XBP1 and controls terminal differentiation in keratinocytes and epidermis, *Br. J. Dermatol.*, **164**, 16–25, doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10046.x.
21. Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013) Cell death by cornification, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 3471–3480, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.
22. Rosdy, M., Bernard, B.A., Schmidt, R., and Darmon, M. (1986) Incomplete epidermal differentiation of A431 epidermoid carcinoma cells, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, **22**, 295–300.
23. Yamazaki, T., Nakano, H., Hayakari, M., Tanaka, M., Mayama, J., and Tsuchida, S. (2004) Differentiation induction of human keratinocytes by phosphatidylethanolamine-binding protein, *J. Biol. Chem.*, **279**, 32191–32195, doi: 10.1074/jbc.M404029200.
24. Huang, C.-S., Ho, W.-L., Lee, W.-S., Sheu, M.-T., Wang, Y.-J., Tu, S.-H., Chen, R.-J., Chu, J.-S., Chen, L.-C., Lee, C.-H., Tseng, H., Ho, Y.-S., and Wu, C.-H. (2008) SP1-regulated p27/Kip1 gene expression is involved in terbinafine-induced human A431 cancer cell differentiation: an *in vitro* and *in vivo* study, *Biochem. Pharmacol.*, **75**, 1783–1796, doi: 10.1016/j.bcp.2008.02.005.
25. Eckert, R.L., Crish, J.F., Efimova, T., and Balasubramanian S. (2004) Antioxidants regulate normal human keratinocyte differentiation, *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 1125–1131, doi: 10.1016/j.bcp.2004.04.029.
26. Cohen, S., and Flescher, E. (2009) Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug, *Phytochemistry*, **70**, 1600–1609, doi: 10.1016/j.phytochem.2009.06.007.
27. Rotem, R., Fingrut, O., Moskovitz, J., and Flescher, E. (2003) The anti-cancer plant stress-protein methyl jasmonate induces activation of stress-regulated c-Jun N-terminal kinase and p38 protein kinase in human lymphoid cells, *Leukemia*, **17**, 2230–2234, doi: 10.1038/sj.leu.2403107.
28. Xiang, X.Y., Yang, X.C., Su, J., Kang, J.S., Wu, Y., Xue, Y.N., Dong, Y.T., and Sun, L.K. (2016) Inhibition of autophagic flux by ROS promotes apoptosis during DTT-induced ER/oxidative stress in HeLa cells, *Oncol Rep.*, **35**, 3471–3479, doi: 10.3892/or.2016.4725.
29. Liang, S.H., Zhang, W., McGrath, B.C., Zhang, P., and Cavener, D.R. (2006) PERK (eIF2 $\alpha$  kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis, *Biochem. J.*, **393**, 201–209, doi: 10.1042/BJ20050374.

## JASMONIC ACID INDUCES ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS WITH DIFFERENT OUTCOME FOR CULTURED NORMAL AND TUMOR EPIDERMAL CELLS

M. S. Vildanova<sup>1\*</sup>, A. A. Saidova<sup>1</sup>, A. I. Fokin<sup>2</sup>, D. M. Potashnikova<sup>1</sup>,  
G. E. Onishchenko<sup>1</sup>, and E. A. Smirnova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: vch41048@mail.ru

<sup>2</sup> Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

Received March 22, 2019

Revised May 27, 2019

Accepted May 27, 2019

Plant hormones may cause cytotoxic effect on human cells and also trigger processes, which are not related to cell death, for instance, stress of biosynthetic system. The goal of our study was to investigate the activation of endoplasmic reticulum (ER) stress by jasmonic acid (JA) and to distinguish the reactions of human cultured immortalized non-tumorigenic HaCaT cells and human epidermoid carcinoma A431 cells to JA. In experiments 2 mM JA concentration was used that suppresses cell proliferation in both cell lines. We analyzed the expression of genes associated with ER stress (*GRP78*, *ATF4*, *CHOP*), the structure of ER and Golgi complex, and synthetic processes in HaCaT and A431 cells. In both cell lines, JA upregulated expression of ER stress genes and caused hypertrophic changes in Golgi complex. However, the activation pattern of ER stress genes in HaCaT and A431 cells was different; in addition, only tumor A431 cells revealed an increased level of involucrin synthesis, suggesting that JA may activate differentiation in these cells. Thus, JA induces ER stress in both cell lines, but the consequences of ER stress for immortalized non-tumorigenic and epidermoid cancer cells are different.

**Keywords:** plant hormones, jasmonic acid, ER stress, differentiation