

На правах рукописи

Ким Ян Сергеевич

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ПОПУЛЯЦИЙ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ
ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК CD133**

1.5.4. – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Лупатов Алексей Юрьевич

Научный консультант: доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН,
Ярыгин Константин Никитич

**Официальные
оппоненты:** **Егоров Егор Евгеньевич**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт молекулярной биологии имени В. А.
Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН),
ведущий научный сотрудник.

Коваленко Елена Ивановна
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
старший научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова
Российской академии наук.

Защита состоится «9» февраля 2023 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.172.01 (Д 001.010.01) при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, д.10, стр.8.

С диссертацией можно ознакомиться в ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича» и на сайте www.ibmc.msk.ru

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы исследования

Увеличивающаяся продолжительность жизни населения развитых и развивающихся стран бросает биологам-исследователям новые вызовы, которые не ограничиваются проблемами учащающихся случаев сердечно-сосудистых и нейро-дегенеративных заболеваний, но и охватывают широкий спектр онкологических заболеваний, напрямую связанных с возрастом человека [DePinho, 2000]. За последние 50 лет понимание причин и механизмов формирования злокачественных новообразований человека значительно углубилось на фоне развития новых инструментальных методов клеточного и молекулярного анализа. Результатом исследований экспериментальной онкологии последних двух десятилетий стало развитие теории раковых стволовых клеток (РСК), ставшей важным дополнением к классической теории клональной эволюции, не способной в полной мере описать всю клеточную гетерогенность, наблюдаемую в опухолевой ткани. Во многих работах было показано, что именно популяция РСК является наиболее агрессивной популяцией опухоли и ответственна за ее быструю прогрессию и рецидивы заболевания [Chang, 2016; Marzagalli и др., 2021].

На сегодняшний момент один из наиболее известных и широко используемых маркеров РСК – CD133 (проминин-1), который нашел свое применение при изучении РСК в широком спектре новообразований человека. Его повышенная экспрессия напрямую коррелирует с высокой туморогенной и метастатической активностью РСК *in vivo*, а также с пролиферативной и клоногенной активностью РСК *in vitro* [Brown и др., 2017; Liou, 2019]. В контексте клинико-патологических характеристик повышенная экспрессия CD133 ассоциируется с негативным прогнозом, высокой степенью злокачественности опухоли и, в целом, с более низкой общей выживаемостью пациентов в случае большинства наиболее распространенных карцином человека [Chen и др., 2013; Han и др., 2016; Zhou и др., 2015]. В связи с этим актуальной задачей становится разработка новых способов терапии, нацеленных на CD133 и ассоциированные с ним молекулярные регуляторные пути.

Несмотря на определенные достижения в этой области камнем преткновения остается недостаток информации о молекулярных каскадах, партнерах и, в целом, о клеточных функциях CD133, делая изучение этих вопросов крайне актуальным.

1.2. Цели и задачи исследования

Цель данной работы – характеристика функциональных и фенотипических особенностей опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии CD133 и выявление молекулярных регуляторов CD133.

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

1. Проанализировать частоту упоминания различных молекул в качестве маркеров РСК в научных публикациях. Оценить относительную значимость CD133 как маркера РСК, а также его ассоциацию с различными типами опухолей.

2. Определить уровень экспрессии CD133 в клеточных линиях различных опухолей человека. На основании полученных результатов выбрать клеточные модели для дальнейшего исследования.

3. Сравнить пролиферативную, а также клоногенную активность клеток, отличающихся по экспрессии CD133.

4. Выявить дифференциально экспрессируемые транскрипты и белки в клетках с различным уровнем экспрессии CD133.

5. С помощью *in silico* анализа предсказать потенциальные молекулярные регуляторы экспрессии CD133 и ранжировать их по вероятности участия в этом процессе.

6. Верифицировать активность наиболее перспективного потенциального молекулярного регулятора CD133 методом shRNA нокдауна или геномного нокаута с использованием CRISPR/CAS9.

1.3. Научная новизна работы

Впервые была продемонстрирована роль транскрипционного фактора TRIM28 в качестве молекулярного регулятора экспрессии маркера раковых стволовых клеток – CD133. Найдены потенциальные регуляторы экспрессии CD133, данные о вовлеченности которых в этот процесс в литературе отсутствуют. Был разработан

и опробован новый алгоритм определения и сравнения митотического индекса (МИ) в популяциях клеток с использованием проточной цитометрии с визуализацией. Также впервые была получена панель клонов Caco2 с полным нокаутом TRIM28 с помощью метода геномного редактирования CRISPR/CAS9.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы

Основная теоретическая значимость работы заключается в открытии нового молекулярного регулятора CD133 – TRIM28, что может помочь в выяснении функции CD133 и определении сигнальных каскадов, в которых он участвует. Кроме того, мы определили дифференциальные протеомные и транскриптомные профили клеток, отличающихся по экспрессии CD133. Эти данные доступны другим исследователям и могут быть использованы ими для дальнейшего изучения молекулярных механизмов, связанных с экспрессией CD133.

С практической точки зрения, полученные данные о регуляции CD133 транскрипционным фактором TRIM28 могут быть востребованы для разработки новых протоколов терапии и диагностики онкологических заболеваний, в которых экспрессия CD133 коррелирует с неблагоприятным прогнозом. Помимо этого, в работе представлены данные о фенотипических и функциональных особенностях различных клеточных линий и предложены новые методологические подходы к их изучению. Это может помочь другим исследователям в выборе клеточных моделей для изучения РСК.

1.5. Личный вклад автора

Работа выполнена в лаборатории клеточной биологии в промежуток с 2014 по 2021 год. Автор проводил поиск и анализ литературных данных для системного обзора, культивирование клеточных линий, сортировку клеток, анализ с помощью проточной цитометрии с визуализацией, функциональные тесты, пробоподготовку для протеомного и транскриптомного анализа, ПЦР в реальном времени, *in silico* анализ данных на платформе GeneXplain, создание лентивирусных и плазмидных CRISPR/CAS9 генетических конструкций, анализ дочерних линий Caco2 с нокдауном и нокаутом TRIM28, статистические анализы и подготовку публикаций.

Соискатель благодарит коллег за проведение панорамного протеомного и полно-транскриптомного анализов, помощь с клеточной сортировкой, *in silico* анализом данных, флуоресцентной микроскопией, публикацией результатов, а также за ценные советы.

1.6. Основные положения, выносимые на защиту

1. CD133 является наиболее часто используемым маркером РСК солидных опухолей, при этом его экспрессия присутствует в небольшом количестве опухолевых линий.

2. Экспрессия CD133 напрямую коррелирует с пролиферативными и клоногенными свойствами клеток в опухолевых линиях.

3. Различные линии клеток не имеют общей молекулярной сигнатуры дифференциально экспрессируемых генов, характерной для популяций с различным уровнем CD133.

4. Транскрипционный фактор TRIM28 может выступать в качестве молекулярного регулятора экспрессии CD133.

5. Полный нокаут TRIM28, но не его нокдаун, приводит к подавлению экспрессии CD133 в линии Caco2.

1.7. Степень достоверности и апробация результатов

Полученные в ходе выполнения работы результаты верифицированы должным образом согласно современным научным представлениям. В каждом эксперименте, в котором это было применимо, проводился подходящий статистический анализ. Помимо этого, все препараты и расходные материалы, использовавшиеся в работе, были сертифицированы, тогда как культуры клеток аутентифицированы с помощью STR-анализа (short tandem repeat). Необработанные данные полнотранскриптомного анализа представлены в базе данных «ArrayExpress» под идентификационным номером E-MTAB-11779, протеомные данные в качестве приложения представлены в публикациях.

1.8. Публикации

По теме диссертации опубликовано 14 работ, 10 из которых представлены в рецензируемых научных журналах, а 4 публикации в трудах конференций.

1.9. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 101 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 19 рисунков. Состоит из следующих глав: введение, обзор литературных источников, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, список литературы, а также включает благодарности, финансирование и приложение.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Системный обзор литературы проводили с использованием оригинальных работ базы данных PubMed, в которых исследователи выделяли популяцию РСК из хирургического материала от пациентов с помощью одного или нескольких маркеров и подтверждали ее функциональные свойства с помощью *in vivo* тестов на иммунодефицитных мышах.

Все линии опухолевых клеток, использованные в работе, аутентифицировали методом коротких tandemных повторов (STR, short tandem repeats) и культивировали в стандартных условиях. Анализ экспрессии мембранных маркеров и клеточную сортировку проводили с использованием проточной цитометрии на приборе FACSAria III. Проточную цитометрию с визуализацией для анализа митотического индекса клеточных популяций проводили на приборе Amnis ImageStreamX Mk II Imaging Flow Cytometer. Иммунофлуоресцентную микроскопию для верификации мембранной экспрессии CD133 проводили с помощью инвертированных микроскопов Nikon Eclipse Ti и Zeiss Axio Observer. Для анализа экспрессии CD133 во всех случаях использовали антитела клона AC133/1, широко зарекомендовавшие себя в исследованиях этого маркера.

Краткосрочный клоногенный тест для анализа митотического индекса проводили в трехдневных колониях клеток, а долгосрочный клоногенный тест для

анализа клоногенных свойств клеток проводили, изучая колонии, полученные после 10 дней культивирования. Цейтраферную съемку клеточной культуры для анализа пролиферативных свойств клеток выполняли на приборе Incucyte ZOOM.

Полнотранскриптомный анализ проводили с использованием полногеномных 4x44K микрочипов Agilent (G4112F), для сканирования которых, использовали G2565CA Microarray Scanner System, а полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы Feature Extraction v10.10.1.1. Дифференциально экспрессируемые в клеточных популяциях белки определяли с помощью тандемной label-free масс-спектрометрии на приборе высокого разрешения Q Exactive, а идентификацию белков проводили с использованием программы MASCOT.

«GO анализ» и последующий анализ ключевых молекулярных регуляторов CD133 проводили на платформе GeneXplain. Транскрипционные факторы, регулирующие выборку дифференциально экспрессируемых транскриптов и белков, а также мастер-регуляторные молекулы анализировали с использованием интегрированных с GeneXplain баз данных TRANSFAC и TRANSPATH.

Лентивирусный нокдаун TRIM28 проводили с использованием shRNA вектора pGPV. CRISPR/CAS9-ассоциированный нокаут гена TRIM28 проводили с использованием плазмиды PX458. Целевые последовательности gRNA выбирали в первом экзоне гена TRIM28 или в его ближайшем окружении. Снижение экспрессии TRIM28 или ее полную потерю в результате нокаута гена определяли с помощью вестерн блота.

Подтверждение достоверности результатов различных методов проводили с помощью статистического анализа во всех случаях, когда это позволял дизайн эксперимента.

3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Анализ частоты упоминаний в научной литературе молекулярных маркеров, используемых для выделения РСК из опухолей человека

Чтобы оценить значимость маркера РСК CD133 в качестве объекта для исследования, мы проанализировали частоту использования различных молекулярных маркеров при выделении РСК из опухолей человека в англоязычных работах. Первичная выборка статей включила в себя 768 работ, из которых мы отобрали для финальной выборки 97 статей, полностью отвечающих поставленным задачам (см. материалы и методы). Результаты системного обзора показали, что именно CD133 наиболее часто используется для выделения РСК из различных опухолей человека (25 работ; **Рисунок 1**), в первую очередь из опухолей нервной

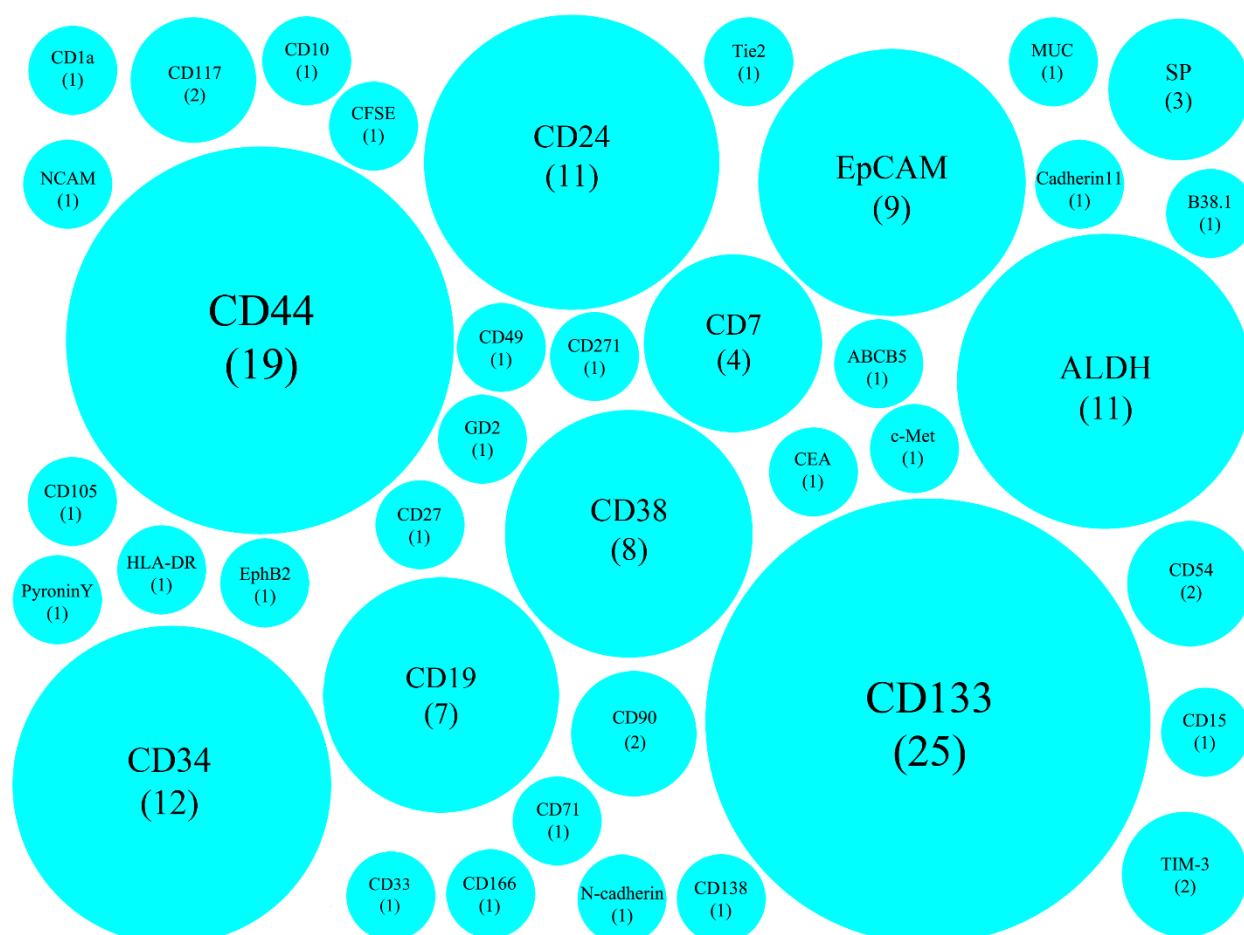


Рисунок 1. Маркеры РСК и количество оригинальных работ (номер в скобках), в которых эти маркеры использовали для выделения популяции РСК с последующим подтверждением ее свойств *in vivo*.

ткани и различных карцином. На втором месте по частоте использования оказался CD44 (19 работ), который применяют для выделения РСК в первую очередь из опухолей железистого эпителия, таких как рак молочной и поджелудочной желез, а также рак толстой кишки. На третьем месте по частоте использования находится CD34 (12 работ), на четвертом CD24 и ALDH (по 11 работ) и на пятом EpCAM (9 работ).

3.2. Определение размера CD133-положительной популяции в опухолевых клеточных линиях

Поскольку исследование функциональных и фенотипических характеристик, ассоциированных с экспрессией CD133, предполагает наличие клеточной модели, включающей популяцию CD133-позитивных клеток, мы определили процент CD133-положительных клеток в группе из 21 клеточной линии различных опухолей человека (Таблица 1). Только четыре клеточные линии из двадцати

Таблица 1. Размер CD133⁺ популяции в различных линиях опухолей человека.

Тип опухоли	Клеточная линия	Процент CD133 ⁺ клеток
Немелкоклеточный рак легких	A549	0
	H23	0
	H358	0
	H460	0
	H1299	0
Колоректальная карцинома	Caco2	99.7 ± 0.3
	HT-29	69.9 ± 21.8
	SW480	0
	HCT116	0
	SW-837	0
Глиобластома	LN-229	0
	T98G	0
	U-87 MG	0
Гепатокарцинома	HUH7	93.4 ± 4.4
Карцинома почки	A704	0
Рак поджелудочной железы	PANC-1	0
Рак щитовидной железы	FTC-133	5.7 ± 4.1
Рак молочной железы	MDA-MB-231	0
Нейробластома	IMR-32	0
Фибросаркома	HT-1080	0
Остеосаркома	U-2 OS	0

одной имели популяцию CD133-положительных клеток – HT-29, Сасо2, HUH7 и FTC-133. В результате анализа пяти биологических повторов процент CD133-положительных клеток в этих четырех клеточных линиях был следующим: HT-29 – 69.9% ± 21.8, Сасо2 – 99.7% ± 0.3, HUH7 – 93.4% ± 4.4, FTC-133 – 5.7% ± 4.1. (Таблица 1). Интересно, что ранее мы показали, что в хирургических образцах колоректального рака, полученных от разных пациентов, процент CD133⁺ клеток

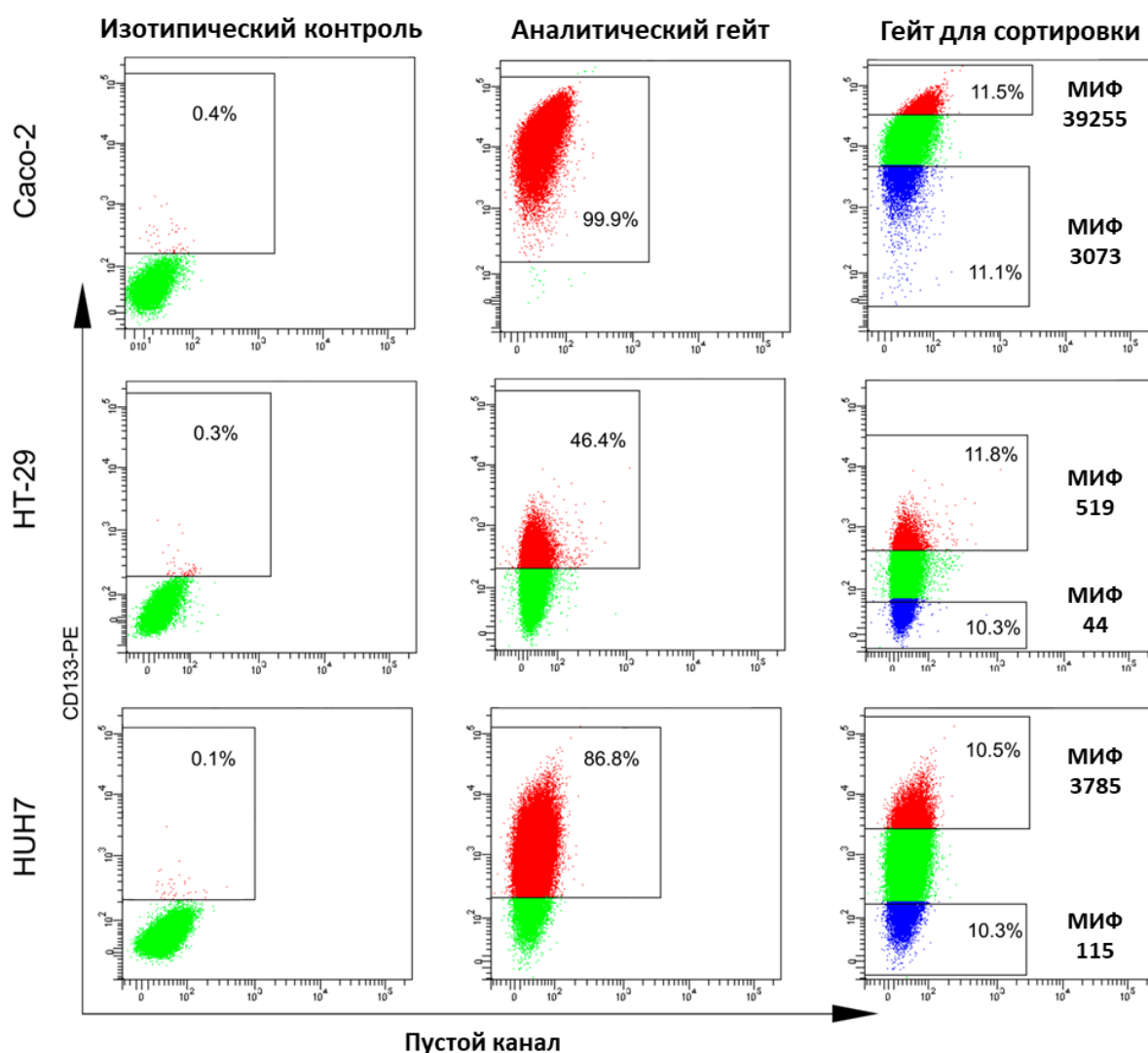


Рисунок 2. Цитометрический анализ экспрессии CD133 в клеточных линиях Сасо2, HT-29 и HUH7, а также стратегия сортировки популяций CD133^{+/high} (красный гейт) и CD133^{-/low} (синий гейт). Левый столбец - изотипический контроль. Средний столбец - пример диаграммы экспрессии CD133 в трех клеточных линиях. Правый столбец - гейты для сортировки CD133^{+/high} и CD133^{-/low} популяций. Гейты устанавливались таким образом, чтобы отношение между их медианами интенсивностей флуоресценции (МИФ) составляло не менее одного порядка.

также сильно варьируется – от 1 до 65% [Gisina и др., 2021]. Из четырех клеточных линий мы выбрали три, у которых объем CD133-положительной популяции был достаточно большим, для проведения дальнейших исследований (**Рисунок 2**). Две из них являлись клеточными линиями колоректального рака (HT-29 и Caco2), а одна клеточной линией гепатоклеточной карциномы (HUN7).

Таким образом, по данным проточной цитометрии 17 клеточных линий не продемонстрировали в своем составе наличие CD133-положительной популяции. Возможно, CD133 не является необходимым для адаптации клеток к росту в условиях *in vitro*, в связи с чем теряется в результате микроэволюции, происходящей в процессе выведения стабильной клеточной культуры. Для выборочного подтверждения данных цитометрии мы использовали две линии немелкоклеточного рака легких – A549 и H460, литературные данные об экспрессии CD133 в которых крайне противоречивы. В итоге с помощью флуоресцентной микроскопии мы подтвердили, что клеточные линии A549 и H460 не имеют положительной по CD133 популяции клеток.

3.3. Сравнительный анализ пролиферативной и клоногенной активности клеток с различным уровнем экспрессии CD133

Поскольку повышенная злокачественность, характерная для РСК, предполагает увеличенную пролиферативную и клоногенную активность, было важно подтвердить корреляцию между экспрессией CD133 и этими функциональными свойствами клеток *in vitro*. Изучение различий в функциональных свойствах клеток с разным уровнем экспрессии CD133 проводили на трех клеточных линиях: Caco2, HT-29 и HUN7. Первым этапом стало определение различий в митотическом индексе (МИ) изучаемых клеточных популяций. Для этого использовали метод проточной цитометрии с визуализацией. Мы адаптировали исходный алгоритм «Wizard Cell Cycle - Mitosis» программы IDEAS, который используется для визуализации митотических клеток таким образом, чтобы можно было сравнивать разные биологические повторы для опухолевых клеточных линий, которые анеуплоидны. С помощью адаптированного алгоритма мы показали, что для все трех клеточных линий МИ

популяции $CD133^{+/high}$ был значимо выше, чем МИ популяции $CD133^{-/low}$ (**Рисунок 3А**). Помимо этого, МИ популяции $CD133^{+/high}$ линий Сасо2 и HUH7 был значимо выше, чем МИ популяции $CD133^{ref}$.

Также мы провели сравнение времени, необходимого для заполнения полного клеточного монослоя клетками популяций $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ линий Сасо2 и HT-29 с использованием цейтраферной фотосъемки. Клетки популяции $CD133^{+/high}$ линии Сасо2 достигали монослоя существенно быстрее, нежели клетки популяции $CD133^{-/low}$ – 12 и 23,5 дней соответственно (**Рисунок 3В**). Для линии HT-29 мы не смогли показать различия во времени достижения монослоя популяциями $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$. Обе культуры достигали монослоя за 11 дней.

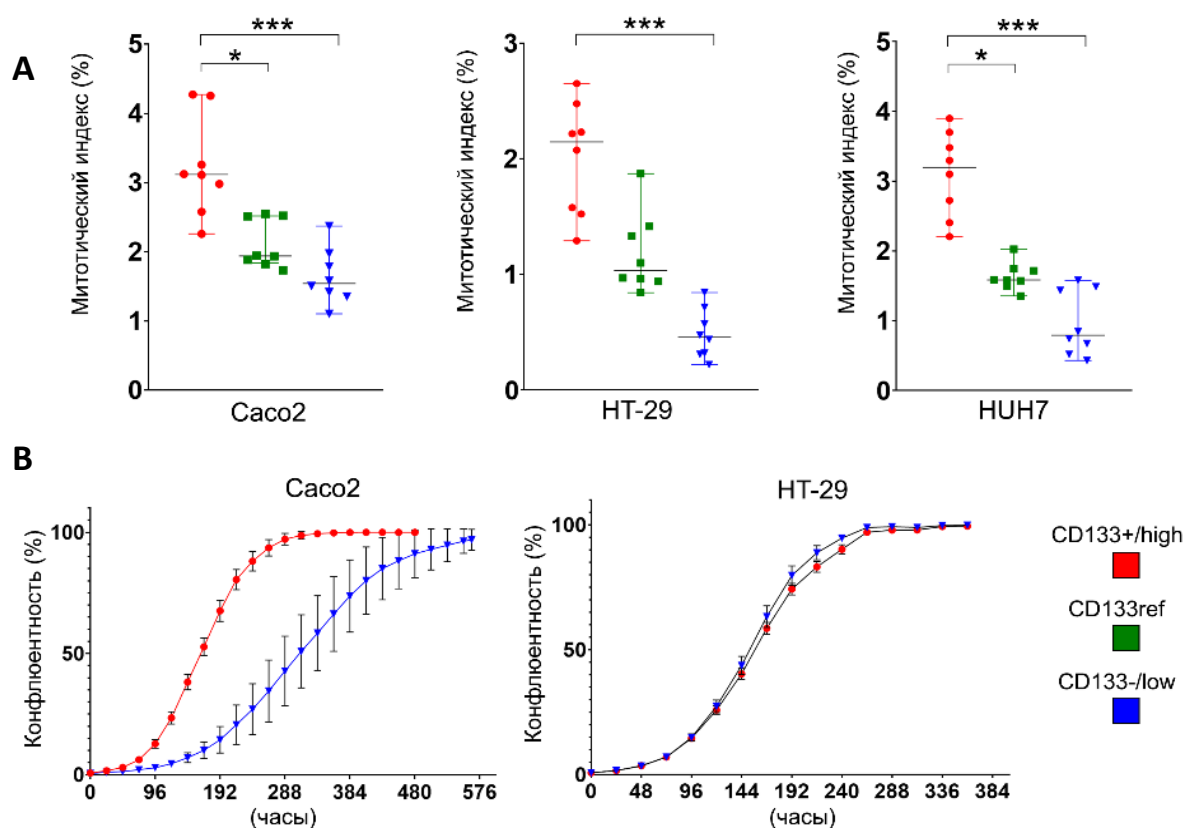


Рисунок 3. А. Измерение митотического индекса (МИ) в клеточных популяциях $CD133^{+/high}$, $CD133^{-/low}$ и $CD133^{ref}$ с помощью адаптированного алгоритма «Wizard Cell Cycle - Mitosis» (представлена медиана и диапазон, $n=8$). В. Кривые роста популяций $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ линий Сасо2 и HT-29, полученные на основании цейтраферной фотосъемки (Сасо2 $n=6$, HT-29 $n=5$; среднее $\pm$ SD).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Помимо этого, мы провели подсчет МИ в трехдневных колониях, полученных из клеток CD133^{+/high}, CD133^{-/low} и CD133^{ref} популяций. В клеточных линиях Caco2 и HT-29 мы подсчитали МИ в 3000 и 3300 колониях соответственно. Параллельно с этим мы подсчитали средний размер колоний, измеряемый в клетках. Так для обеих клеточных линий различие МИ в группах CD133^{+/high} и CD133^{-/low} было достоверным (**Рисунок 4**). Также достоверное отличие в МИ мы показали для групп CD133^{+/high} и CD133^{ref} линии HT-29. Остальные попарные сравнения МИ в группах не показали достоверных отличий. При сравнении размера колоний, полученных из клеток линии HT-29, были выявлены достоверные отличия между всеми тремя группами: CD133^{+/high}, CD133^{-/low} и CD133^{ref} (**Рисунок 4**). Для клеточной линии Caco2 единственное достоверное отличие было показано для групп CD133^{+/high} и CD133^{-/low}. Помимо этого, с помощью долгосрочного

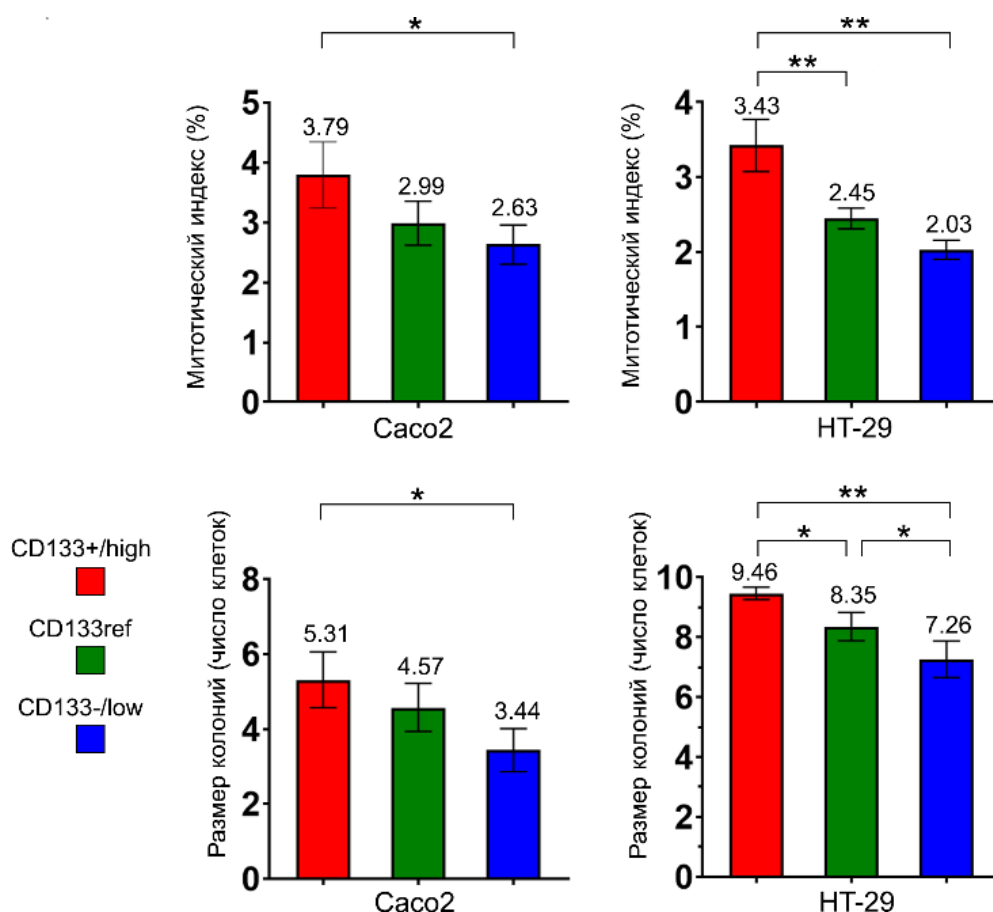


Рисунок 4. Измерение митотического индекса (верхний ряд) и размера колоний (нижний ряд), полученных из клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

клоногенного теста мы показали, что популяции CD133^{+/high} линии Сасо2 сформировали в среднем в 1.9 раза больше колоний, нежели клетки популяции CD133^{-/low}. Для клеточной линии НТ-29 среднее отношений составило 1.5.

Таким образом, мы показали, что клетки с большим уровнем экспрессии CD133 имеют большую пролиферативную и клоногенную активности и чаще находятся в состоянии митоза нежели клетки с более низким уровнем экспрессии CD133. Полученные нами результаты на *in vitro* моделях совпадают с данными исследований, демонстрирующих прямую корреляцию между экспрессией CD133 опухолевыми клетками и их агрессивными свойствами, включая повышенную пролиферативную и клоногенную активность [Kohga и др., 2010; Zhang и др., 2020].

3.4. Анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков в клетках CD133^{+/high} и CD133^{-/low}: результаты полнотранскриптомного анализа с помощью ДНК-микрочипов и панорамного протеомного профилирования с использованием тандемной масс-спектрометрии

Для анализа дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков клеточных популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low} линий Сасо2, НТ-29 и НУН7 мы использовали методы полнотранскриптомного анализа с помощью микрочипов и панорамного протеомного профилирования методом тандемной масс-спектрометрии.

Число транскриптов, экспрессия которых была повышена или понижена в клеточной популяции CD133^{+/high}, было соответственно: 7 и 3 для линии НТ-29, 14 и 57 для линии Сасо2, 53 и 13 для линии НУН7. Повышенная экспрессия только одного гена была найдена одновременно в популяциях CD133^{+/high} всех трех клеточных линий – непосредственно CD133.

Помимо транскриптомного анализа мы также провели протеомный анализ клеточных популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low} линий Сасо2, НТ-29 и НУН7. Общее число белков, которые были определены в трех биологических повторах обеих клеточных популяций было следующим: 2541 для линии Сасо2, 2007 для линии НТ-29 и 1565 для линии НУН7. Число белков, экспрессия которых была повышена

или понижена в популяции CD133^{+/high} было соответственно: 17 и 22 для Caco2, 24 и 11 для HT-29, 62 и 13 для HUH7. Мы не нашли ни одного общего для всех трех клеточных линий дифференциально экспрессирующегося белка.

3.5. Анализ экспрессии маркеров нормальных стволовых клеток в популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low} методом ПЦР в реальном времени

Одним из главных вопросов, возникающих при исследовании РСК, является вопрос их сходства с нормальными СК. Поскольку мы не обнаружили различий в экспрессии факторов, ответственных за стволовые свойства клеток с помощью молекулярного профилирования, было решено направленно проанализировать их экспрессию методом ПЦР в реальном времени.

Для сравнения мы выбрали пять генов, ответственных за сохранение недифференцированного состояния клетки, три гена, ответственных за повышенную устойчивость СК к различным химическим веществам и один ген, отвечающий за самообновление стволовой популяции клеток: OCT4a, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, ABCB1, ABCG2, ALDH1A1 и BMI-1. Экспрессию транскрипта CD133 использовали как положительный контроль. Результаты анализа методом ПЦР в реальном времени показали, что единственным транскриптом, экспрессия которого достоверно отличалась в популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low}, явился сам CD133. Таким образом, исходя из данных полнотранскриптомного анализа и ПЦР в реальном времени можно сделать вывод, что уровень экспрессии транскриптов, характерных для СК, не коррелирует с экспрессией CD133 ни в одной из трех опухолевых клеточных линий – Caco2, HT-29 и HUH7.

3.6. *In silico* анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков: «Gene ontology» анализ

Для того чтобы понять, к каким общим группам, исходя из их функций и принадлежности к определенному компартменту, относятся найденные дифференциально экспрессирующиеся транскрипты и белки, мы провели *in silico* «GO анализ». Его результаты показали, что 5 общих терминов группы «клеточные компоненты» включают общие свойства, которые можно объединить понятиями «внеклеточное пространство» и «экзосомы». Это согласуется с литературными

данными, которые демонстрируют, что экзосомы, содержащие CD133, участвуют в регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки [Bauer и др., 2011; Dubreuil и др., 2007]. Мы предположили, что во всех трех клеточных линиях существуют общие молекулярные регуляторные механизмы, лежащие в основе выявленных групп дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков, несмотря на их полное различие между линиями. Поэтому следующим шагом стало определение молекулярных регуляторов, лежащих в основе групп найденных дифференциально экспрессирующихся генов.

3.7. *In silico* поиск молекулярных ключевых регуляторов экспрессии CD133

Путем объединения списков дифференциальной экспрессии в CD133^{+/high} и CD133^{-/low} клетках в один для каждой клеточной линии мы получили шесть групп дифференциально экспрессирующихся генов (по три для протеомного и транскриптомного анализа). Полученные группы загружали на платформу GeneXplain для поиска молекулярных ключевых регуляторов CD133 (**Рисунок 5**). Подход основывался на использовании базы данных TRANSFAC для поиска кандидатных транскрипционных факторов (TFs), лежащих в основе работы анализируемой группы генов (1). База данных TRANSPATH использовалась для

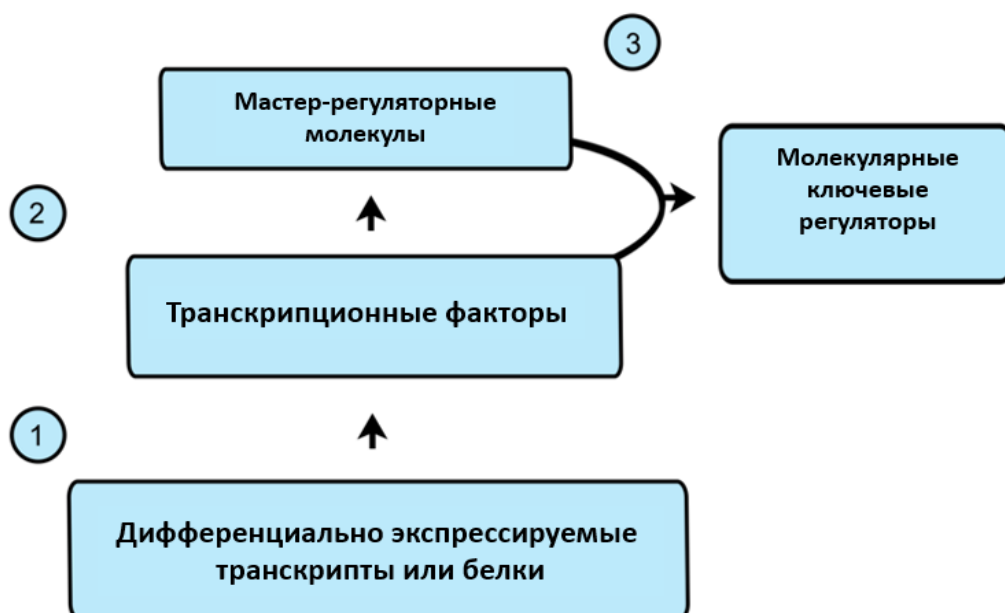


Рисунок 5. Алгоритм получения списка ключевых молекулярных регуляторов CD133 с помощью платформы GeneXplain.

поиска потенциальных мастер-регуляторных молекул (MRs), контролирующих полученную на предыдущем этапе выборку транскрипционных факторов (2). Финальный список ключевых регуляторов CD133 (KRs) получили с помощью объединения итоговых списков транскрипционных факторов и мастер-регуляторных молекул (3).

Для выявления наиболее значимых объектов из полученных списков TFs, MRs и KRs была использована система ранжирования, которая основывалась на частоте

Таблица 2. Потенциальные молекулярные ключевые регуляторы экспрессии CD133, найденные в результате *in silico* анализа.

Ключевой регулятор	Ранг TFs	Ранг MRs	Суммарный ранг
TRIM28	5	5	10
RELA	5	3	8
MYB	4	4	8
CREB1	4	2	6
REST	4	2	6
TP53	4	2	6
CEBPA	3	3	6
GABPB1	3	2	5
NANOG	2	2	4
E2F1	2	2	4
E2F3	2	2	4
E2F4	2	2	4
E2F7	2	2	4
EGR1	2	2	4
HIF1A	2	2	4
HMGA1	2	2	4

встречаемости объектов среди различных групп. За каждое наличие гена в одном из шести списков TFs или одном из шести списков MRs ему присваивался один бал. Путем суммирования рангов объектов в финальных списках TFs и MRs были получены ранги для списка KRs (**Таблица 2**). Наибольшее количество баллов получили следующие ключевые регуляторы: TRIM28 (10 баллов), RELA (8 баллов) и MYB (8 баллов). Остальные KRs имели 4, 5 или 6 баллов (**Таблица 2**). Для четырех KRs, предсказанных в результате анализа, уже имеются экспериментальные данные об их участии в регуляции экспрессии CD133: HIF1A, RELA, TP53 и NANOG. Мы выбрали KR с максимальным рангом – TRIM28 для верификации его участия в регуляции CD133 путем подавления его экспрессии в клетках.

3.8. Проверка гипотезы об участии TRIM28 в регуляции экспрессии CD133 с помощью shRNA инициированного нокдауна и CRISPR/CAS9 инициированного нокаута

Для определения влияния TRIM28 на экспрессию CD133 мы решили получить клетки со стабильным нокдауном TRIM28. Для этого была выбрана линия Caco2, в которой практически все клетки экспрессируют CD133, что упрощает выявление клеток в случае снижения его экспрессии при нокдауне TRIM28. Несмотря на успешно прошедшую трансдукцию, эффективность которой была близка к 100% и успешное подавление TRIM28, изменений в уровне экспрессии мембранного CD133 обнаружено не было. Это могло быть связано с тем, что даже уменьшенное количество TRIM28 способно обеспечить экспрессию CD133. Исходя из этого предположения мы решили провести полный нокаут TRIM28.

Для получения нокаута по TRIM28 с помощью CRISPR/CAS9 мы также использовали клеточную линию Caco2. Мы вывели 51 клон, каждый из которых принадлежал экспериментальной либо одной из контрольных групп (**Рисунок 6**). Экспрессию гена TRIM28 на уровне белка подтверждали с помощью вестерн блота во всех случаях. Уровень экспрессии CD133 измеряли с помощью проточной цитометрии. Тест Краскала-Уолиса показал, что между пятью тестируемыми группами есть статистически значимые различия; тест Дана, проведенный *post hoc*, выявил, что уровень экспрессии CD133 в клетках с нокаутом TRIM28 достоверно ниже, нежели уровень экспрессии CD133 в каждой из четырех контрольных групп (**Рисунок 6**).

Так кратность изменения МИФ в группе «КО» по отношению к группам «Failed KO», «Ref KO», «Clones» и группе дикого типа были соответственно: 7.8, 9.7, 10.3 и 11.1. Необходимо отметить, что между последними четырьмя группами статистически значимых различий найдено не было (*post hoc* тест Данна >0.05 для каждого сравнения), что подтверждает специфичность действия нокаута TRIM28 в отношении CD133.

Для того чтобы исключить влияние на интенсивность флуоресценции возможного изменения размера клетки, вызванного нокаутом TRIM28, мы оценили

уровень прямого светорассеяния, который косвенно коррелирует с размером клетки (**Рисунок 6**). Тест Краскала-Уолиса не показал статистически значимых различий между прямым светорассеянием всех пяти изучаемых групп.

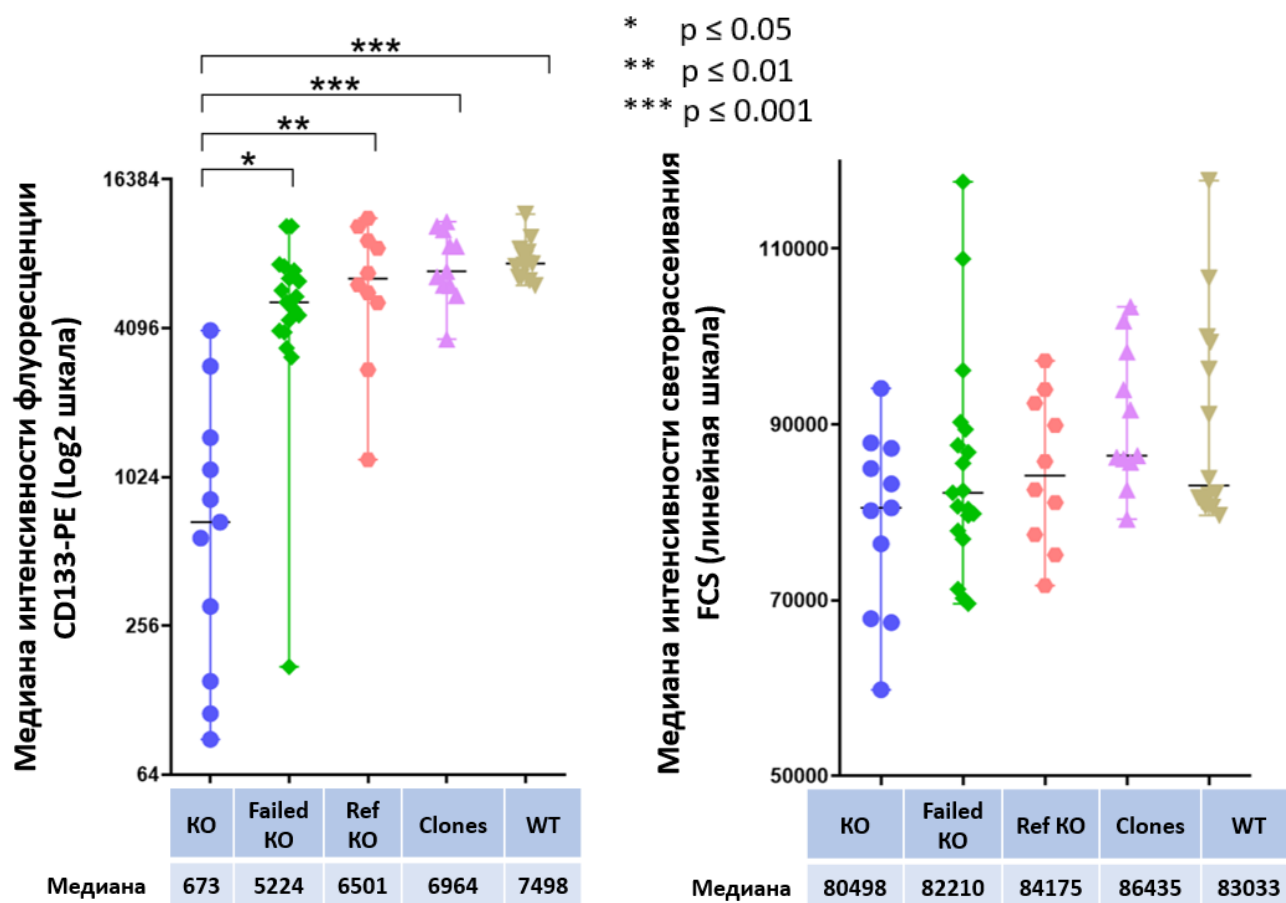


Рисунок 6. Результаты цитометрического анализа, показывающие снижение экспрессии CD133 в результате нокаута TRIM28. Левая диаграмма – медиана интенсивности флуоресценции (МИФ) anti-CD133-PE антител на клетках Caco2 с полным нокаутом TRIM28 и четырех группах негативного контроля (шкала Log2). Правая диаграмма – прямое светорассеяние (FSC) клеток Caco2 с полным нокаутом TRIM28 и клеток четырех групп негативного контроля (линейная шкала). «KO» – клоны с полным нокаутом TRIM28 (n=11); «Failed KO» - клоны, подвергшиеся действию CRISPR/CAS9, но в которых нокаут TRIM28 не прошел (n=19); «Ref KO» - рефентные клоны, подвергшиеся действию CRISPR/CAS9 против белка, не встречающегося у млекопитающих tagRFP (n=10); «Clones» - клоны Caco2, не подвергшиеся действию геномного редактирования (n=11); «WT» - дикий тип, клеточная линия Caco2 (n=14).

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

Следовательно, снижение экспрессии CD133 не является результатом уменьшения размера клеточной поверхности.

В дополнение к проточной цитометрии мы подтвердили влияние нокаута TRIM28 на экспрессию CD133 с помощью флуоресцентной микроскопии на нескольких клонах (**Рисунок 7**). Таким образом, мы показали, что TRIM28 является молекулярным регулятором CD133 и может участвовать в формировании ассоциированной с экспрессией CD133 клеточной внутриопухолевой гетерогенности.

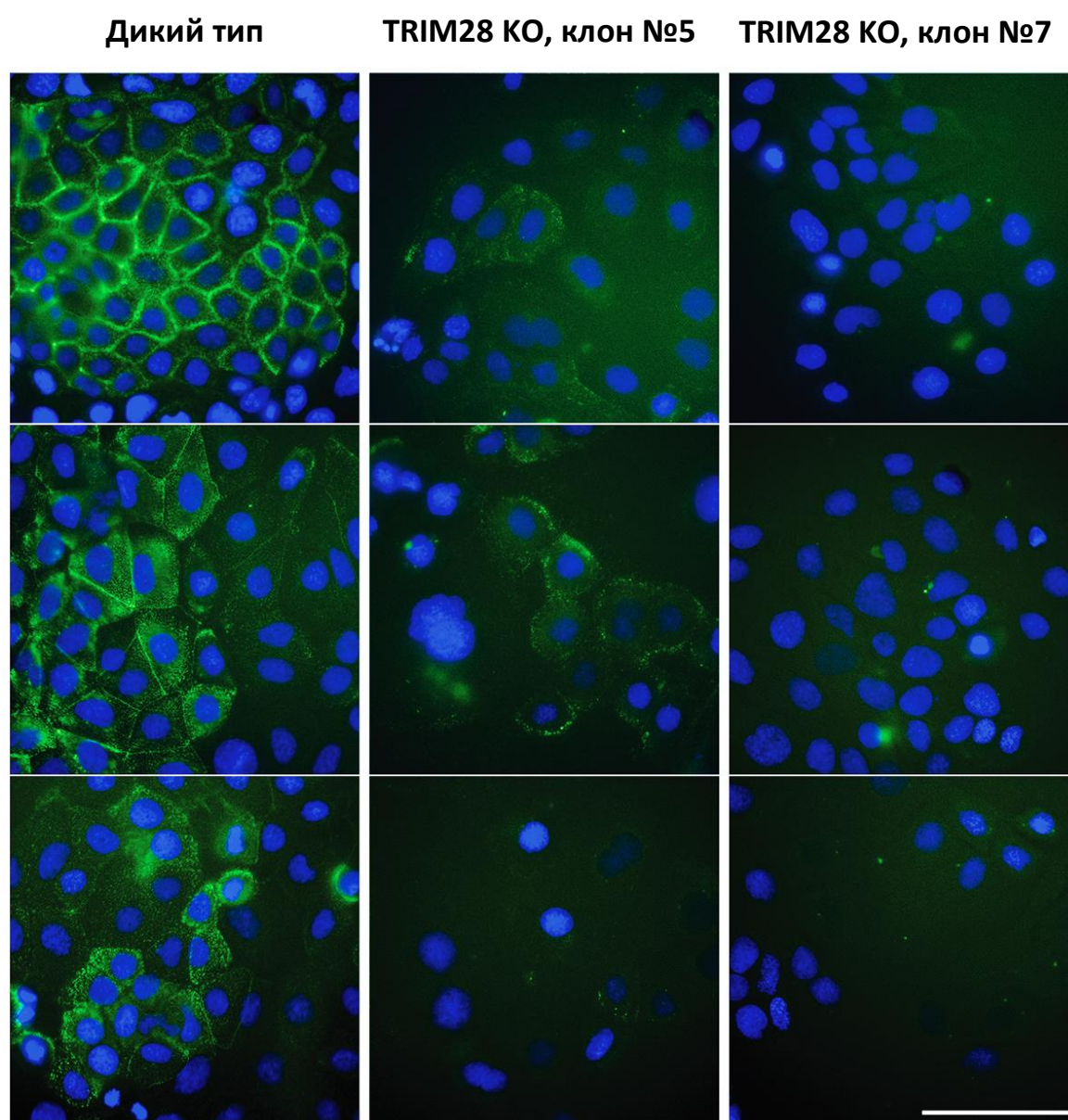


Рисунок 7. Мембранная экспрессия CD133 (зеленое свечение) в клетках Caco2 дикого типа и с нокаутом TRIM28. Флуоресцентная микроскопия. Окрашивание: DAPI и anti-CD133-VioBright FITC. Масштабная полоска – 100 мкм.

4. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.** Bauer N et al. Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles-a role of the endocytic-exocytic pathway // *EMBO Mol Med*. 2011. T. 3. № 7. С. 398–409.
- 2.** Brown D et al. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intratumor heterogeneity // *PLoS One*. 2017. T. 12. № 2.
- 3.** Chang J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance // *Medicine (United States)*. 2016. T. 95. № 1. С. S20–S25.
- 4.** Chen S et al. CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *PLoS One*. 2013. T. 8. № 2. С. 1–9.
- 5.** DePinho R. The age of cancer // *Nature*. 2000. T. 408. С. 248–254.
- 6.** Dubreuil V et al. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1 // *Journal of Cell Biology*. 2007. T. 176. № 4. С. 483–495.
- 7.** Gisina A et al. CEACAM5 overexpression is a reliable characteristic of CD133-positive colorectal cancer stem cells // *Cancer Biomarkers*. 2021. T. 32. № 1. С. 85–98.
- 8.** Han M et al. Clinicopathological and Prognostic Significance of CD133 in Glioma Patients: A Meta-Analysis // *Mol Neurobiol*. 2016. T. 53. № 1. С. 720–727.
- 9.** Kohga K et al. Expression of CD133 confers malignant potential by regulating metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma // *J Hepatol*. 2010. T. 52. № 6. С. 872–879.
- 10.** Liou G. Y. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019. T. 106. С. 1–7.
- 11.** Marzagalli M et al. Cancer Stem Cells-Key Players in Tumor Relapse // *Cancers (Basel)*. 2021. T. 376. № 13.
- 12.** Zhang Z et al. Human CD133-positive hematopoietic progenitor cells enhance the malignancy of breast cancer cells // *BMC Cancer*. 2020. T. 20. № 1.
- 13.** Zhou Q et al. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: a meta-analysis // *Int J Clin Exp Med*. 2015. T. 8. № 3. С. 3080–3088.

5. ВЫВОДЫ

1. CD133 является наиболее часто упоминаемым в научных статьях маркером РСК, ассоциированным с солидными опухолями. Значимость CD133 в качестве маркера РСК подтверждена высокой туморогенностью CD133⁺ опухолевых клеток в иммунодефицитных мышах.

2. Из 21 клеточной линии различных опухолей человека лишь в 4 присутствует популяция CD133⁺ клеток. Линии колоректальной карциномы Сасо2 и НТ-29, а также гепатоклеточной карциномы HUN7 явились наиболее подходящей моделью для решения задач данного исследования.

3. Пролиферативная и клоногенная активность клеток с фенотипом CD133^{+/high} больше, чем у клеток с фенотипом CD133^{-/low}.

4. Были выявлены дифференциально экспрессирующиеся транскрипты и белки, экспрессия которых отличается не менее чем в 2 раза в CD133^{+/high} и CD133^{-/low} клетках. При этом количество дифференциальных транскриптов составило: 10 в НТ-29, 71 в Сасо2, 66 в HUN7, а количество дифференциальных белков: 39 в Сасо2, 35 в НТ-29, 75 в HUN7.

5. С помощью *in silico* анализа были предсказаны и ранжированы в порядке вероятности их участия в регуляции экспрессии CD133 16 потенциальных молекулярных регуляторов. Наивысший рейтинг получил транскрипционный фактор TRIM28.

6. Геномный нокаут TRIM28 с использованием CRISPR/CAS9 подавляет экспрессию CD133, что свидетельствует об участии этого транскрипционного фактора в молекулярной регуляции CD133.

6. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. Kim Y, Potashnikova D, Gisina A, Kholodenko I, Kopylov A, Tikhonova O, Kurbatov L, Saidova A, Tvorogova A, Kholodenko R, Belousov P, Vorobjev I, Zgoda V, Yarygin K, Lupatov A. TRIM28 is a novel regulator of CD133 expression associated with cancer stem cell phenotype // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol.23, №17. P.9874.
2. Gisina A, Novikova S, Kim Y, Sidorov D, Bykasov S, Volchenko N, Kaprin A, Zgoda V, Yarygin K, Lupatov A. CEACAM5 overexpression is a reliable characteristic of CD133-positive colorectal cancer stem cells // *Cancer Biomarkers*. 2021. Vol.32, №1. P.85–98.
3. Ким Я.С., Кайдина А.М., Чанг Ю.Х., Ярыгин, К.Н., Лупатов, А.Ю. Молекулярные маркеры раковых стволовых клеток, верифицированные *in vivo* // *Биомедицинская химия*. 2016. Том.62, №3. С.228–238.
4. Kholodenko I, Kim Y, Gisina A, Lupatov A, Kholodenko R, Yarygin K. Analysis of the Correlation between CD133 Expression on Human Colorectal Adenocarcinoma Cells HT-29 and Their Resistance to Chemotherapeutic Drugs // *Bull Exp Biol Med*. 2021. Vol.171, №1. P.156–163.
5. Гисина А.М., Ким Я.С., Ярыгин К.Н., Лупатов А.Ю. Выявление «боковой популяции», ассоциированной с активностью АТР-зависимых транспортеров, при помощи проточной цитометрии с визуализацией // *Биомедицинская химия*. 2021. Том.67, №2. С.137–143.
6. Gisina A, Kim Y, Gabashvili A, Tsvetkova A, Vakhrushev I, Yarygin K, Lupatov A. Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) in tumor spheroids of human colorectal adenocarcinoma cells // *Bull Exp Biol Med*. 2020. Vol.170, №1. P.135–141.
7. Gisina A, Kim Y, Potashnikova D, Tvorogova A, Yarygin K, Lupatov A. Proliferative activity of colorectal cancer cells with different levels of CD133 expression // *Bull Exp Biol Med*. 2019. Vol.167, №4. P.541–545.

8. Лупатов А.Ю., Гисина А.М., Ким Я.С., Быкасов С.А., Волченко Н.Н., Сидоров Д. В., Ярыгин К.Н. Экспрессия ганглиозида GD2 на клетках колоректальной аденокарциномы // Биомедицинская химия. 2020. Том.66, №1. С.95–99.

9. Suvorov R, Kim Y, Gisina A, Chiang J, Yarygin K, Lupatov A. Surface molecular markers of cancer stem cells: computation analysis of full-text scientific articles // Bull Exp Biol Med. 2018. Vol.166, №1. P.135–140.

10. Belousov P, Bogolyubova A, Kim Y, Abrosimov A, Kopylov A, Tvardovskiy A, Lanshchakov K, Sazykin A, Dvinskikh N, Bobrovskaya Y, Selivanova L, Shilov E, Schwartz A, Shebzukhov Y, Severskaia N, Vanushko V, Moshkovskii S, Nedospasov S, Kuprash D. Serum immunoproteomics combined with pathological reassessment of surgical specimens identifies TCP-1 ζ autoantibody as a potential biomarker in thyroid neoplasia // JCEM. 2015. Vol. 100, № 9. P. E1206–E1215.

Работы, опубликованные в сборниках материалов научных конференций:

11. Ким Я.С. и др. Функциональная и фенотипическая характеристика клеточных популяций с различной экспрессией маркера стволовых клеток CD133 // III Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, 6-8 декабря, 2017. Успехи молекулярной онкологии, 2017, Т.4, №4, 68-69.

12. Gisina A, Kim Y et al. Proliferative and clonogenic capacity of colorectal cancer cells with different CD133 expression level // 2nd International Conference «Cancer Stem Cells: Impact on Treatment», Австрия, Тироль, 11-15 декабря, 2018.

13. Lupatov A, Kim Y et al. Post-genomic study of CD133 positive tumor cells associated with colorectal cancer stem cell phenotype // 2nd International Conference «Cancer Stem Cells: Impact on Treatment», Австрия, Тироль, 11-15 декабря, 2018.

14. Лупатов А.Ю., Гисина А.М., Ким Я.С. и др. Молекулярное профилирование раковых стволовых клеток колоректальной аденокарциномы с использованием клеточных линий и образцов опухолевой ткани // V Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, 16-18 декабря, 2019, Москва. Успехи молекулярной онкологии, 2019, Т.6, №4, с.37.

7. БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит руководителя и коллег за помощь в проведении работы, а также родных, близких и сочувствующих за неоценимую поддержку во время проведения исследования. В частности, автор благодарен к.б.н. Поташниковой Д.М. и к.б.н. Гисиной А.М. за помощь в проведении цитометрического анализа и клеточной сортировки; проф. Згоде В.Г., к.б.н. Копылову А.Т., Курбатову Л.К., к.б.н. Тихоновой О.В. за помощь в проведении масс-спектрометрического и полно-транскриптомного анализа; проф. Воробьеву И.А, Твороговой А.В и к.б.н. Саидовой А.А. за помощь в проведении флуоресцентной микроскопии; к.б.н. Холоденко И.В и к.б.н. Холоденко Р.В. за помощь в проведении вестерн блота, а также благодарен научному руководителю к.б.н. Лупатову А.Ю. и научному консультанту д.б.н., член-корр. РАН Ярыгину К.Н. за помощь в освоении методологической базы и обсуждение исследования на всех его этапах.