

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

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н.

Лупатов Алексей Юрьевич

Научный консультант:

д.б.н., член-корр. РАН

Ярыгин Константин Никитич

Москва 2022

Оглавление

1. ВВЕДЕНИЕ	6
1.1. Актуальность темы исследования	6
1.2. Цели и задачи исследования.....	7
1.3. Научная новизна работы	8
1.4. Теоретическая и практическая значимость работы.....	8
1.5. Личный вклад автора	8
1.6. Основные положения, выносимые на защиту	9
1.7. Степень достоверности и апробация результатов	9
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	11
2.1. Предпосылки развития теории РСК: гипотеза о возникновении опухолей из стволовых клеток, мышинные модели в исследовании туморогенности опухолевых клеток.....	11
2.2. Теория клональной эволюции и ранняя теория РСК	14
2.3. Интегративная теория клеточной гетерогенности опухолей и современные представления о РСК	18
2.4. Перспективы использования РСК в качестве мишени для терапии опухолей	21
2.5. CD133 как маркер РСК, его возможные функции и молекулярные партнеры	23
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	27
3.1. Системный обзор литературы: определение частоты использования CD133 в качестве маркера популяции РСК.....	27
3.2. Культивирование клеточных линий.....	27
3.3. Проточная цитометрия и клеточная сортировка	28
3.4. Проточная цитометрия с визуализацией.....	29

3.5. Иммунофлуоресцентная микроскопия.....	29
3.6. Сравнительный анализ времени удвоения клеточных популяций.....	29
3.7. Краткосрочный клоногенный тест: подсчет митотического индекса	30
3.8. Долгосрочный клоногенный тест.....	30
3.9. Выделение РНК	31
3.10. Сравнительный полнотранскриптомный анализ клеточных популяций	31
3.11. Подбор праймеров для ПЦР	32
3.12. ПЦР в реальном времени	33
3.13. Сравнительный протеомный анализ клеточных популяций.....	33
3.14. In silico анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков.....	34
3.15. In silico анализ молекулярных ключевых регуляторов CD133.....	35
3.16. Нокаун генов с помощью лентивирусной трансдукции shRNA.....	35
3.17. Нокаут генов методом геномного редактирования с использованием CRISPR/CAS9.....	36
3.18. Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн блот	36
4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	38
4.1. Анализ частоты упоминаний в научной литературе молекулярных маркеров, используемых для выделения РСК из опухолей человека.....	38
4.2. Определение размера CD133-положительной популяции в опухолевых клеточных линиях	40
4.3. Функциональные особенности клеток с различным уровнем экспрессии CD133.....	44

4.3.1. Сравнительный анализ митотического индекса клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133 методом проточной цитометрии с визуализацией	44
4.3.2. Сравнительный анализ времени удвоения клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133	47
4.3.3. Сравнительный анализ митотического индекса популяций и размера колоний, полученных из клеток с различным уровнем экспрессии CD133 при краткосрочном культивировании.....	48
4.3.4. Сравнительный анализ клоногенных и пролиферативных свойств клеток с различным уровнем экспрессии CD133.....	50
4.4. 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	52
4.5. Анализ экспрессии маркеров нормальных стволовых клеток в популяциях CD133 ^{+/high} и CD133 ^{-/low} методом ПЦР в реальном времени	53
4.6. <i>In silico</i> анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков: «Gene ontology» анализ	54
4.7. <i>In silico</i> поиск молекулярных ключевых регуляторов экспрессии CD133.....	56
4.8. Проверка гипотезы об участии TRIM28 в регуляции экспрессии CD133 с помощью shRNA инициированного нокдауна	58
4.9. Проверка гипотезы об участии TRIM28 в регуляции экспрессии CD133 с помощью нокаута, инициированного CRISPR/CAS9	58
5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	63
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	69
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	72
8. БЛАГОДАРНОСТИ	83

9. ФИНАНСИРОВАНИЕ	84
10. ПРИЛОЖЕНИЕ	85

1. ВВЕДЕНИЕ

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 опухолевой 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.

По теме диссертации опубликовано 14 работ, 10 из которых представлены в рецензируемых научных журналах, а 4 публикации в трудах конференций. Результаты работы были представлены в виде устного доклада на следующих конференциях: III Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, 6-8 декабря 2017, Москва, «Функциональная и фенотипическая характеристика клеточных популяций с различной экспрессией маркера стволовых клеток CD133»; 2nd International Conference «Cancer Stem Cells: Impact on Treatment», 11-15 декабря 2018, Австрия, «Post-genomic study of CD133 positive tumor cells associated with colorectal cancer stem cell phenotype»; V Всероссийская Конференция по молекулярной онкологии, 16-18 декабря, 2019, Москва. «Молекулярное профилирование раковых стволовых клеток колоректальной аденокарциномы с использованием клеточных линий и образцов опухолевой ткани».

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

2.1. Предпосылки развития теории РСК: гипотеза о возникновении опухолей из стволовых клеток, мышинные модели в исследовании туморогенности опухолевых клеток

Исходно теория РСК постулировала связь между популяциями РСК и нормальных стволовых клеток (СК), причем некоторые исследователи, включая родоначальников теории РСК, докторов Дика и Бонэ, предполагали прямую взаимосвязь между ними и считали, что популяция РСК происходит из СК, подвергшейся трансформации [Bonnet, Dick, 1997]. Идея происхождения опухолевой клетки из стволовой не нова и уходит своими корнями в начало 20-го века.

В 1907 году доктор Ашкенази в ходе изучения кистозной тератомы яичника пришел к выводу, что дифференцированная соматическая ткань тератомы в ходе эмбриогенеза происходит либо из одного мультипотентного типа клеток, либо из группы клеток, содержащей клетки всех зародышевых листков [Askanazy, 1907]. Таким образом, первый раз была высказана гипотеза, что все клетки опухоли могут происходить из недифференцированных опухолевых СК. Лишь к середине 20-го века несколько лабораторий смогли представить косвенные свидетельства в поддержку этой гипотезы, проводя свои исследования на той же модели тератомы яичника мыши [Fawcett, 1950; Fekete, Ferrigno, 1952; Jacson, Bruece, 1941]. Более весомое экспериментальное доказательство этой гипотезы было получено чуть позже доктором Пирсом в ходе исследования восстановления полного фенотипа (рекапитуляции) тератокарциномы после подкожного введения мыши «эмбрионидных телец», изначально полученных в другой мыши путем внутрибрюшинного введения единичных клеток [Pierce, Dixon, 1960]. Подобные «эмбрионидные тельца» состояли всего из трех типов клеток, демонстрируя морфологию, сходную с морфологией раннего эмбриона мыши, тогда как изначальная опухоль состояла как минимум из 15 типов клеток. Таким образом, впервые было показано, что тератокарцинома может развиваться из

«злокачественных стволовых» клеток организма. Кроме работ с моделью тератомы мыши, особый интерес представляет работа доктора Райта, который в ходе исследований опухолей нервной системы пришел к выводу, что медуллобластома может развиваться из группы нейрональных предшественников, нейробластов [Wright, 1910]. Таким образом, к середине 20-го века сформировался пласт экспериментальных исследований, который позволял высказывать гипотезу о происхождении опухолей из прогениторных или СК с разной степенью злокачественности.

В то же время, в 1937 году группе исследователей удалось воспроизвести как лимфоидную, так и миелоидную лейкемию в инбредных линиях мышей с помощью одной опухолевой клетки [Furth, Kahn, 1937]. Важно отметить, что процент успешной рекапитуляции был низок, поскольку всего 5 из 97 мышей двух различных линий сформировали опухоли. Эта работа была пионерской в области получения опухолей с помощью одной клетки; до этого исследователям, также работавшим на инбредных линиях мышей, удавалось лишь приблизиться к порогу

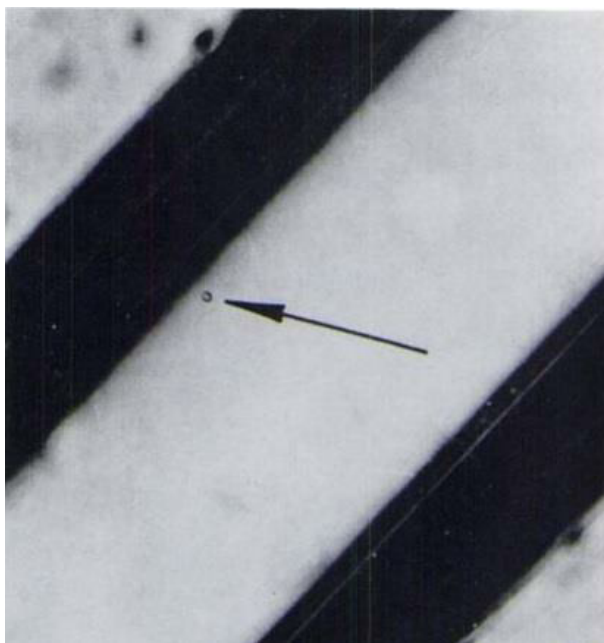


Рисунок 1. Одна клетка, изолированная в капилляре под микроскопом. X100. Приведено по [Kleinsmith, Pierce, 1964].

в несколько тысяч клеток [Richter, McDowelle, 1933]. Работая с неинбредными мышами, приходилось увеличивать и это количество клеток на два порядка [Gaetangi, Blothner, 1936].

В солидных опухолях впервые удалось добиться трансплантации с помощью одной клетки лишь в 1964 году на модели все той же тератокарциномы мыши [Kleinsmith, Pierce, 1964]. Авторы работы в ходе исследования 43 клеточных линий мыши, полученных в результате внутрибрюшинного и подкожного введения мышам с помощью капилляра (**Рисунок 1**) одной клетки «эмбрионидных телец»,

обнаружили, что часть клеточных линий дифференцировались в доброкачественную ткань. В своих выводах они подвергли сомнению мутационный характер опухолевого процесса, а также его необратимость, высказав гипотезу, что в его основе лежит «опухолевая стволовая» клетка. Эффективность трансплантации опухоли с помощью одной клетки в этой работе в зависимости от способа введения не превышала 11%. Вышеприведенные исследования, основанные на модели тератомы мыши, впоследствии легли в основу теории и методологии эмбриональных СК. Важно отметить, что мышинные модели анализа способности к восстановлению всей опухоли различными популяциями опухолевых клеток заложили методологический базис для формирования теории РСК и подтверждения свойств РСК *in vivo*.

В середине 20-го века начал развиваться метод определения пролиферирующих клеток с помощью радиоизотопной метки. Вместе с методом автордиографии он позволил измерять пролиферативную активность и время жизни клеток, а также иерархию клеточных структур [Clermont, Leblond, 1953]. Используя ^3H -тимидиновую метку, доктора Пирс и Уолэс обнаружили, что основное накопление радиоактивного вещества в перевиваемой плоскоклеточной эпидермоидной карциноме крысы в первые часы после введения происходит в недифференцированных клетках, которые находятся вокруг «островков» дифференцированных клеток [Pierce, Wallace, 1971]. Кроме того, миграция маркированных ^3H -тимидином примитивных клеток в подобные «островки» сопровождается их дифференцировкой с утратой туморогенных свойств. Таким образом, исследователи пришли к выводу, что рост опухоли поддерживается в основном примитивными клетками, которые после дифференцировки теряют способность восстанавливать изначальную опухоль. Данные результаты вновь подтвердили гипотезу вовлеченности злокачественной СК в канцерогенез. Гематологические опухоли также демонстрировали пролиферативную гетерогенность и иерархическую структуру [Clarkson и др., 1967], заставляя исследователей искать причину рецидивов этих опухолей в медленно пролиферирующих СК лейкемии [Clarkson, 1969].

Приведенные выше работы и ряд других побудили доктора Пирса развить гипотезу «опухоли, как карикатуры нормального процесса самообновления ткани», которая в дальнейшем легла в основу первоначальной концепции РСК. Он высказал ее впервые на четвертой канадской конференции по вопросам рака в 1961 году [Pierce, 1961], но четко сформулировал и изложил только через три десятилетия [Pierce, Speers, 1996]. Основную идею этой гипотезы он сформулировал так: «Концепция неоплазии, основанная на онкологических принципах и принципах развития организма и утверждающая, что опухолевый процесс представляет собой «карикатуру» нормального процесса самообновления ткани в связи с наличием в опухолевом массиве смеси злокачественных стволовых клеток, которые обладают заметной, однако ограниченной способностью к дифференцировке и пролиферации в гомеостатических условиях. В свою очередь, дифференцируясь, эти клетки могут стать доброкачественными клетками - потомками злокачественных клеток». И хотя основной идеей его теории была ошибочная идея опухоли как более примитивной стадии развития той ткани, из которой она произошла, и в связи с этим - актуальность дифференцировочной терапии рака, доктор Пирс стал одним из первых ученых, который начал высказывать идею о том, что в канцерогенезе могут участвовать клетки, обладающие свойствами стволовых. Однако, для тщательной экспериментальной проверки этой гипотезы в середине 20-го века еще не хватало инструментальной базы, которая только начинала формироваться в это время, точно так же, как четкого понимания, что такое нормальная СК.

2.2. Теория клональной эволюции и ранняя теория РСК

Открытие в 1911 году Раусом вируса, который вызывает саркому у кур, и который впоследствии был назван в его честь вирусом саркомы Рауса (Raus Sarcoma Virus, RSV), дало толчок развитию онкогенной теории формирования рака [Rous, 1911]. Открытие десятков новых онкогенов и генов онкосупрессоров, а также различных генетических aberrаций, происходящих в опухолевой клетке,

позволили доктору Новел в 1976 году высказать теорию клональной эволюции [Nowell, 1976]. Он сформулировал ее так: «Предполагается, что большинство новообразований развиваются из одной клетки и прогрессируют благодаря приобретению генетической вариабельности клетками родительского клона, что позволяет селекционно отбирать его более агрессивные субклинки. Популяция опухолевых клеток, по всей видимости, более генетически нестабильна, нежели популяция нормальных клеток. Приобретение генетической нестабильности и ассоциированный с ним селекционный процесс, наиболее четко демонстрирующийся цитогенетическими методами, приводит к прогрессирующим опухолям человека, крайне индивидуальным как кариотипически, так и биологически. Следовательно, новообразование каждого отдельного взятого человека может нуждаться в индивидуальной, специфической терапии, и даже это может затрудняться появлением клонов, генетически устойчивых к лечению». С этого момента фокус научных работ, посвященных генезису раковых новообразований, окончательно сместился в сторону онкогенетической парадигмы, и работы, ставшие впоследствии базисом для развития теории РСК, были забыты более чем на двадцать лет.

В 90-х годах прошлого века в стандартную лабораторную практику входит метод проточной цитометрии и клеточной сортировки (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting), в простейшей своей форме разработанный и запатентованный в 1968 году [Dittrich, Göhde, 1971]. Кроме того, в исследованиях гемопоэтических СК получает широкое распространение ксенографтный метод с использованием иммунодефицитных мышей. Эти два обстоятельства подготовили почву для становления теории РСК.

Феномен различий в туморогенной активности клеток опухолей вновь обратил на себя внимание научного сообщества в середине 90-х годов, когда канадские исследователи Дик и Бонэ обнаружили, что вне зависимости от подтипа острой миелоидной лейкемии (Acute Myeloid Leukemia, AML), раковые клетки могут успешно трансплантироваться в мышей линии NOD/SCID (non-obese diabetic mice with severe combined immunodeficiency disease, мыши с тяжелым комбинированным

иммунным дефицитом на фоне диабета I-го типа), однако, все эти клетки должны иметь фенотип $CD34^{++}CD38^{-}$ [Bonnet, Dick, 1997]. Причем подобные клетки способны генерировать большое количество колониеобразующих единиц и лейкозных предшественников, которые экспрессируют такую же комбинацию поверхностных молекул, как и родительская опухоль, полученная от пациента. Таким образом, данная популяция полностью восстанавливала разнообразие, которое при инокуляции мыши было ограничено фенотипом $CD34^{++}CD38^{-}$. Интересно, что во всех образцах, полученных от больных, объем этой популяции был очень небольшим – от 0.02 до 2%. Именно тогда авторами работы были высказаны две гипотезы, которые легли в основу ранней теории РСК. Во-первых, было сделано предположение, что совпадение фенотипов нормальной кроветворной СК и РСК лейкемии объясняется происхождением РСК из СК. В пользу этого предположения также говорил небольшой объем РСК, близкий к объему пула нормальных СК. И, во-вторых, как и в случае нормального кроветворения, для острой миелоидной лейкемии была предложена иерархическая структура на вершине которой находится популяция РСК, являющаяся движущим фактором прогрессии опухоли.

Первые сравнения ранней теории РСК с теорией клональной эволюции носили характер противопоставления. Так подчеркивалось, что в модели клональной эволюции отсутствует четкая предопределенная разница в туморогенности между отдельными клонами в массиве опухоли и появление

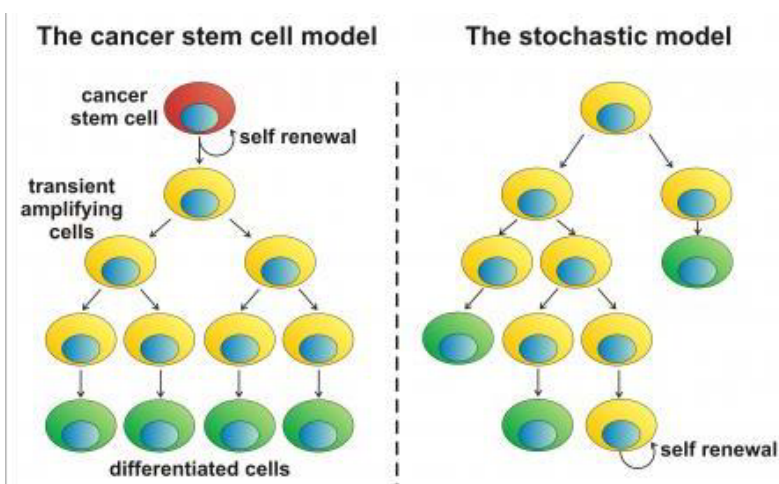


Рисунок 2. Ранняя модель теории раковой стволовой клетки и стохастическая модель теории клональной эволюции. Рисунок приведен по данным <http://www.eurostemcell.org>

более туморогенного клона носит стохастический, случайный характер, который с трудом поддается предсказанию. В свою очередь, ранняя модель РСК говорила о наличии четкой иерархии внутри многообразия опухолевых клеток, на вершине которой стоит популяция РСК, обладающая исключительной туморогенной способностью. Подчеркивалось, что только популяция РСК обладает способностью к самообновлению (self-renew) и дает начало различным более «дифференцированным» клонам раковых клеток, имеющим транзиторный характер «стволовости» и ограниченный потенциал самообновления. Последние, в свою очередь, давали начало не способным к самообновлению «дифференцированным» раковым клеткам. Именно из-за способности к неограниченному самообновлению и дифференцировке, которые свойственны нормальной СК, стоящей на вершине гистогенеза, подобную сверхтуморогенную «примитивную» раковую клетку называли раковой стволовой клеткой. Таким образом, проводилась четкая аналогия между иерархией у нормальных СК и РСК. Схематическое изображение моделей ранней теории РСК и модели стохастической прогрессии опухоли представлено на **рисунке 2**.

Первая работа, показавшая наличие РСК в солидных опухолях, была проведена в 2003 году на модели рака молочной железы [Al-Hajj и др., 2003]. Группа под руководством доктора Кларка выделила минорную популяцию высокотуморогенных клеток, которая имела особый фенотип $CD44^{+}CD24^{-/low}$. Менее чем 100 клеток с подобным фенотипом могли полностью восстановить опухоль в иммунодефицитных мышцах, тогда как для восстановления опухолей с помощью $CD44^{+}CD24^{+}$ клеток приходилось использовать десятки тысяч клеток (**Рисунок 3**). Интересно, что никаких морфологических различий между высоко- и низкотуморогенной популяцией клеток рака молочной железы исследователями найдено не было.

Работы, показавшие наличие в опухоли популяции высокотуморогенных клеток заложили методологическую базу с помощью которой РСК были выявлены во многих типах опухолей человека, включая опухоли толстой кишки [O'Brien и др., 2007], яичников [Varat и др., 2005], простаты [Collins и др., 2005], легкого

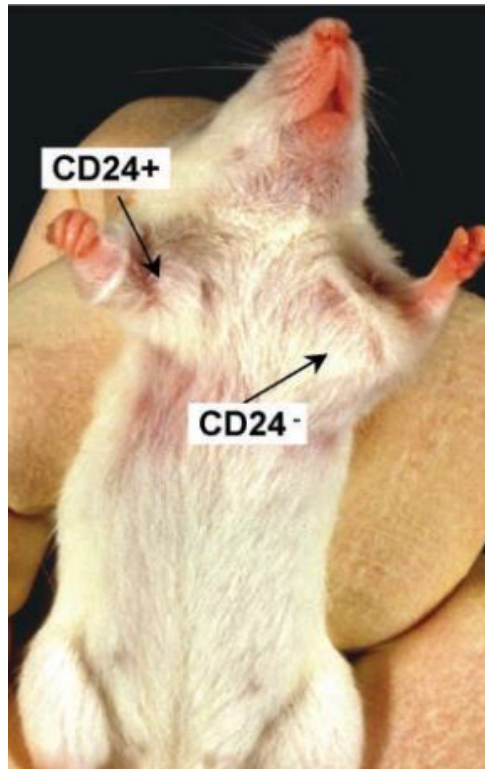


Рисунок 3. Различие в туморогенности клеток рака молочной железы с фенотипом $CD44^+CD24^{-/low}$ и фенотипом $CD44^+CD24^+$ (обе инъекции по 10^4 клеток). Приведено по [Al-Hajj и др., 2003].

[Eramo и др., 2008], печени [Cao и др., 2011], меланому [Fang и др., 2005], а также другие новообразования человека. Большинство работ были построены по единому принципу: 1) выбирался один или несколько маркеров, предположительно ассоциированных с фенотипом РСК; 2) на основании выбранных маркеров изолировались популяции с противоположным фенотипом; 3) различие в туморогенных свойствах этих популяций демонстрировали на моделях иммунодефицитных мышей. Интересно отметить, что процент высокотуморогенных клеток разнился и составлял, в зависимости от природы опухоли и методов выделения, от 0,1% до 10%, что примерно соответствовало

проценту удачных имплантаций опухолей с помощью одной клетки в экспериментах середины 20-го века. По-видимому, в удачных экспериментах исследователи случайно брали клетки со свойствами РСК.

2.3. Интегративная теория клеточной гетерогенности опухолей и современные представления о РСК

Несмотря на непротиворечивость ранней теории РСК доказательства возникновения опухолей в результате трансформации нормальных СК оказались крайне скудными. Основная часть работ была направлена на исследование функциональной гетерогенности клеток, которая была связана с экспрессией маркеров РСК. Появлялось все больше работ, которые анализировали

функциональные различия между клетками более чем двух популяций [Hansford и др., 2007; Pode-Shakked и др., 2013], демонстрируя богатое популяционное разнообразие в составе опухоли. Более того, было показано, что в одном типе опухоли с помощью разных независимых маркеров можно выделить несколько популяций высоко туморогенных клеток, каждая из которых обладает свойствами РСК [Li и др., 2007]. Важно отметить, что работы по имплантации раковых клеток редко показывали исключительную туморогенность РСК, а обычно лишь демонстрировали их повышенную туморогенность по сравнению с другими раковыми клетками. Эти факты дали повод предположить пластичную природу популяции РСК. Так в ряде работ обе популяции РСК и не-РСК обладали способностью превращаться в клетки противоположного фенотипа [Lau и др., 2014]. Этот факт противоречил представлению о РСК как о стабильной популяции опухолевых клеток, обладающей исключительной туморогенностью, стоящей в основании четкой иерархической структуры опухоли и происходящей из нормальных СК. С другой стороны, существуют работы, продемонстрировавшие, что исходной опухолевой клеткой была клетка со стволовым фенотипом [Barker и др., 2009]. Не вызывает сомнения, что нормальной клетке для злокачественной трансформации необходима возможность накапливать мутации и, соответственно, делиться, а значит обладать определенными свойствами стволовой или прогениторной клетки. Однако недавние работы демонстрируют наличие пластичности также у нормальных СК, которые могут воспроизводить дифференцированных потомков, способных к де-дифференцировке при определенных условиях [Post, Clevers, 2019]. Таким образом, вопрос о степени дифференцированности первой трансформированной клетки, дающей начало остальным опухолевым клеткам, а также о взаимосвязи РСК и нормальных СК остается до сих пор открытым.

В настоящее время не вызывает сомнения, что в составе опухоли сосуществуют популяции злокачественных клеток с разными функциональными и фенотипическими особенностями. Неоспоримым вкладом теории РСК является осознание того, что в основе такой клеточной гетерогенности лежит не только

процесс селекции генотипов, наиболее приспособленных к дальнейшей прогрессии, но и эпигенетические особенности клеток, связанные с их пластичностью.

Таким образом, теории РСК и клональной эволюции перестают конкурировать друг с другом и вместе объясняют наблюдаемые исследователями факты. Клональная эволюция характеризует процесс появления опухолевых клеток и их прогрессию по пути последующего увеличения злокачественности. В то время как теория РСК объясняет клеточное разнообразие, которое формируется в рамках одного клона в процессе развития опухоли.

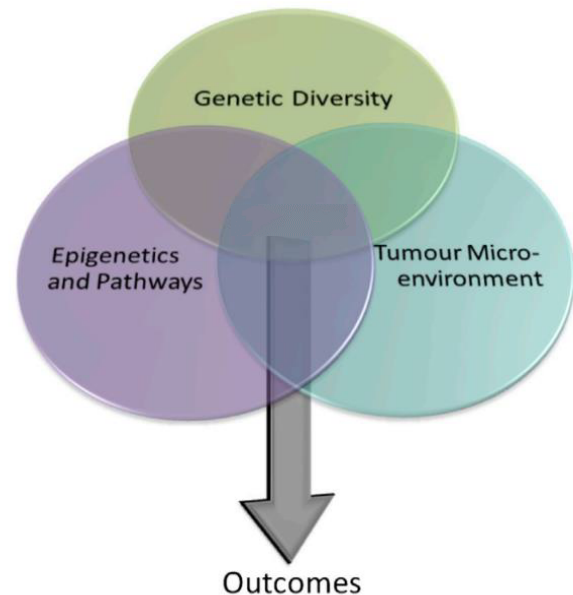


Рисунок 4. Три главных фактора интегративной теории клеточной гетерогенности опухоли. Картинка приведена с небольшими изменениями из статьи [Kreso, Dick, 2014].

Еще одним важным фактором, влияющим на клеточную гетерогенность опухоли, является ее микроокружение. Опухоль состоит не только из раковых клеток, но и инфильтрующих ее лимфоцитов, опухоль-ассоциированных фибробластов, клеток эндотелия и других типов клеток. Все эти группы клеток влияют на опухолевые клетки, стимулируя их пластичность, дискриминируя определенные опухолевые фенотипы, формируя провоспалительную среду или проявляя иммуносупрессорные свойства, тем самым формируя клеточное опухолевое разнообразие [Kreso, Dick, 2014](Рисунок 4).

2.4. Перспективы использования РСК в качестве мишени для терапии опухолей

Поскольку клеточная гетерогенность опухолей является одной из главных причин устойчивости опухоли к терапии, необходима разработка новых способов терапии, которые смогли бы ее учитывать. Популяция РСК является наиболее агрессивной клеточной популяцией опухоли, обладающей повышенной резистентностью к химио- и радиотерапии за счет сверхэкспрессии различных АВС-транспортеров (АВС, АТР-binding cassette) и ДНК-репараторов. В связи с этим РСК являются одной из главных причин рецидивов заболевания [Visvader, 2011]. При этом поведение рецидивирующей опухоли часто оказывается гораздо более агрессивным, нежели первичной, что объясняется селективным преимуществом, которое получают более туморогенные клетки РСК после устранения клеток-конкурентов. Один из наиболее известных представителей семейства АВС-транспортеров белок ABCG2, ответственен за эксклюзивную транспортировку различных химиотерапевтических веществ и сверхэкспрессируется в РСК ряда опухолей [Jia и др., 2013; Samanta, Pursell, 2013]. Так клетки немелкоклеточного рака легких с фенотипом CD133⁺ABCG2⁺ способны к более эффективному блокированию действия цисплатина [Bertolini и др., 2009]. Определенные трудности в разработке терапии, нацеленной против АВС-транспортеров, связаны с тем, что их экспрессия не уникальна для РСК. Тем не менее, существуют практические работы, которые изучают такую возможность [Karthika и др., 2022]. Интересно отметить, что на использовании АВС-транспортеров, которые откачивают флуоресцентный краситель Hoechst 33342, основан метод «боковой популяции», с помощью которого можно изолировать популяцию клеток, существенно обогащенную РСК [Wolmarans и др., 2018].

Разрабатываются и другие методы терапии онкологических заболеваний, нацеленные на РСК. Так мишенями могут выступать поверхностные маркеры РСК. Один из наиболее часто используемых маркеров РСК – CD44 является рецептором, который связывается с гиалуроновой кислотой, фибронектином, ламинином и, в целом, является белком, ответственным за взаимодействие клетки с ее

микроокружением [Ху и др., 2020], облегчая тем самым клеткам опухоли прогрессию и метастазирование [Senbanjo, Chellaiah, 2017]. В качестве маркера РСК он выявлен в большом количестве разнообразных опухолей, включая рак молочной [Olsson и др., 2011] и поджелудочной желез [Sung и др., 2009], карциному желудка [Lau и др., 2014], простаты [Palapattu и др., 2009], толстого кишечника [Wang и др., 2017] и других опухолей. В связи с важной ролью CD44 в канцерогенезе существуют работы, исследующие CD44 в качестве перспективной мишени для терапии онкологических заболеваний. Показано, что нокдаун CD44 в клетках, выделенных из хирургического материала пациентов с раком молочной железы, делает опухолевые клетки менее туморогенными *in vivo* [Pham и др., 2011]. Помимо этого, моноклональные антитела против CD44, введенные мышам с иммунодефицитом, существенно снижают популяцию трансплантированных клеток острой миелоидной лейкемии [Jin и др., 2006]. Авторы считают, что это происходит за счет нарушения миграции клеток опухоли в свои ниши.

Касаясь взаимодействия РСК с их микроокружением, исследователи выделяют в отдельную форму терапию рака, основанную на прицельном ингибировании белков, ответственных за взаимодействие клеток РСК с клетками ниши. Наиболее часто в этом свете говорят о разработке лекарств, направленных на нарушение взаимодействия CXCL12/CXCR4. CXCL12 является лигандом для хемокинового рецептора CXCR4 и их взаимодействие является важным фактором при инвазии РСК, миграции и выживании клеток этой популяции [López-Gil и др., 2021; Mortezaee, 2020]. Один из наиболее часто используемых ингибиторов – AMD3100 (плериксафор), является антагонистом CXCR4. Показано, что AMD3100 блокирует миграцию, пролиферацию и выживание РСК медуллобластомы и глиобластомы [Rubin и др., 2003].

Еще одной возможной мишенью для таргетной терапии являются молекулярные сигнальные пути РСК, многие из которых они делят с популяцией нормальных СК [Yang и др., 2020]. Так, например, активация рецепторов NOTCH4 и NOTCH1 была показана в РСК молочной железы, причем их ингибирование приводило к уменьшению активности этих клеток *in vitro* и уменьшению их

туморогенных свойств *in vivo* [Harrison и др., 2010]. Помимо этого, ингибирование с помощью малой молекулы РР трансфера в цитоплазму β -катенина, связанного со стволовой программой клетки в рамках сигнального пути Wnt/ β -катенин, приводит к уменьшению колониобразующих свойств РСК *in vitro* в клеточной линии рака легкого [Zhang и др., 2015].

Одним из наиболее современных подходов к разработке таргетной терапии, направленной против РСК, является использование ингибиторов miRNA, специфичных для этой популяции. Так нокдаун miR-21 – молекулы, специфичной для РСК разных опухолей [Zhu и др., 2007], ингибирует клеточную пролиферацию, миграцию и, в целом, опухолевый рост в случае рака молочной железы и яичника [Lou и др., 2010; Yan и др., 2011]. Также потенциальной формой таргетной терапии является стимуляция «дифференцировки» РСК, т.е. приобретение клетками этой популяции менее туморогенного фенотипа. Одним из веществ, вызывающих «дифференцировку» РСК, могут быть ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDACI), использование которых в случае опухолей головы и шеи изменяет фенотип РСК и приводит к их апоптозу [Chikamatsu и др., 2013].

Основной проблемой, возникающей при разработке новых терапевтических подходов, направленных на подавление РСК, является отсутствие уникальных маркеров и сигнальных путей, характерных только для этой клеточной популяции. Зачастую РСК на фоне злокачественного фенотипа реализуют молекулярные механизмы, характерные для нормальных СК. В этой связи важной задачей является изучение молекулярных маркеров, характерных как для нормальных, так и для опухолевых стволовых клеток. Выступая в качестве маркеров РСК, они, как правило, проявляют новые свойства, характерные именно для опухолевых клеток. Одним из таких маркеров является CD133.

2.5. CD133 как маркер РСК, его возможные функции и молекулярные партнеры

В 1997 году в журнале «Blood» вышли 2 статьи докторов Мираглии и Йин, работающих в одной лаборатории, посвященных клонированию, определению

структуры и сравнению тканевой экспрессии нового поверхностного гликопротеина AC133, а также получению гибридомы, продуцирующей моноклональные антитела против этой молекулы [Miraglia и др., 1997; Yin и др., 1997]. Было показано, что экспрессия этого белка напрямую коррелирует с экспрессией маркера предшественников гемопоэтических клеток CD34. Кроме того, экспрессия CD133 была обнаружена в клетках печени плода, фетальных клетках гемопоэтического ряда, а также фетальном костном мозге. Впоследствии этот гликопротеин был определен как ортолог мышинового белка проминина, в результате чего он получил еще одно название проминин-1 (PROM1) [Corbeil и др., 1998] и ему присвоили один из номеров поверхностного кластера дифференцировки – CD133.

В качестве маркера РСК он стал рассматриваться уже в 2003 году в работе доктора Синга, которая была посвящена выделению РСК из различных типов опухолей мозга [Singh и др., 2003]. CD133 был выбран в качестве маркера РСК, поскольку его экспрессия присутствует в нормальных нейрональных предшественниках [Uchida и др., 2000]. Авторы работы показали, что CD133⁺ клетки обладают способностью к восстановлению и поддержанию своей популяции, что характерно для РСК, причем наибольшая экспрессия CD133 выявляется у высоко злокачественной медуллобластомы, а наименьшая, у глиомы низкой степени злокачественности.

Таким образом, наряду с белками CD44 и CD24, гликопротеин CD133 оказался одним из первых маркеров РСК, который исследователи использовали для выделения и изучения этой популяции в солидном типе опухолей. В дальнейшем роль CD133 в качестве маркера РСК была показана для широкого списка опухолей человека, делая его наиболее востребованным в первую очередь при выделении РСК из карцином: легкого [Bertolini и др., 2009; Eramo и др., 2008; Hsu и др., 2011], яичника [Curley и др., 2009], желудка [Attia и др., 2019], толстого кишечника [O'Brien и др., 2007; Ricci-Vitiani и др., 2007], желчного пузыря [Shi и др., 2011], головы и шеи [Chu и др., 2013], поджелудочной железы [Hermann и др., 2007], а также опухолей нервной системы [Bao и др., 2006; Bayin и др., 2014], лимфом

[Medina и др., 2014], саркомы Юинга [Suvà и др., 2009] и ряда других новообразований человека. Важно отметить, что экспрессия CD133 напрямую коррелирует с неблагоприятным прогнозом и негативными клинико-патологическими характеристиками у пациентов с различными онкологическими заболеваниями [Gokulan, Devaraj, 2021; Huang и др., 2018; Li и др., 2015; Li и др., 2015]. CD133 экспрессируется и в клетках различных нормальных тканей, преимущественно стволовых и прогениторных. Помимо экспрессии в гемопоэтических стволовых клетках [Yin и др., 1997], его экспрессию показали в нормальных стволовых и прогениторных клетках тканей мозга, простаты, почки и ряда других органов [Richardson и др., 2004; Rountree и др., 2007; Tamaki и др., 2002; Ward и др., 2011].

Существует крайне мало информации о функции CD133 в клетке. Было показано, что он локализуется преимущественно в выростах внешней мембраны [Weigmann и др., 1997] и играет важную роль в ее структуризации [Thamm и др., 2019]. В первую очередь, по-видимому, это касается высокоспециализированных структур, таких, например, как мембраны клеток фоторецепторов, поскольку, *Prom1*^{-/-} мыши теряют зрение [Zacchigna и др., 2009]. CD133 ассоциирован со специфическими липидными рафтами и, очевидно, как-то участвует в передаче молекулярных сигналов в первую очередь в клетках стволового и прогениторного типа. Микродомены мембраны, которые содержат CD133, могут участвовать в выборе пути дифференцировки гемопоэтических СК, причем, это происходит за счет выделения CD133-содержащих везикул [Bauer и др., 2011]. Похожие процессы происходят также в ходе (нейро)эпителиальной дифференцировки клеток [Corbeil и др., 2010]. Поскольку CD133-содержащие микрочастицы были обнаружены во многих жидкостях тела человека, существует гипотеза о широкой вовлеченности CD133 в формирование и функционирование различных тканей [Marzesco и др., 2005].

Известны некоторые молекулярные партнеры и сигнальные пути, которые ассоциированы с CD133. Так гистоновая деацетилаза 6 (HDAC6) способна непосредственно взаимодействовать с CD133 и β -катенином, образуя комплекс,

который не позволяет последнему ацетилироваться и деградировать [Mak и др., 2012]. Стабилизированный β -катенин активирует целевые гены в ядре, что приводит к ускорению опухолевого роста [Gong, Huang, 2012]. Помимо этого, фосфорилирование остатка тирозина-828 CD133 приводит к активации молекулярного пути PI3K (phosphoinositide 3-kinase, фосфоинозитид 3-киназа) путем непосредственного взаимодействия CD133 и 85кДа субъединицы PI3K [Wei и др., 2013]. В свою очередь, нокдаун CD133 ингибирует активность PI3K/Akt и увеличивает выживаемость мышей с иммунодефицитом в тестах по ксенотрансплантации опухолевых клеток. Цитоплазматический регион CD133 (аминокислотные остатки 845-857) также участвует во взаимодействии с киназой Src, что приводит к активации последней [Liu и др., 2016]. В свою очередь, активированная Src фосфорилирует FAK (Focal Adhesion Kinase), что приводит к усилению миграционных свойств клеток линии SW460. Помимо этого, существуют данные о внутриклеточных и внешних стимулах, которые влияют на регуляцию CD133. Эти стимулы включают гипоксию [Hashimoto и др., 2011], дисфункцию митохондрий [Griguer и др., 2008], а также широкий спектр молекул, среди которых транскрипционные факторы [Iida и др., 2012], цитокины [You, Ding, 2010], miRNA [Ma и др., 2010; Zhang и др., 2012] и ряд других.

Несмотря на наличие определенной информации о молекулярных партнерах CD133, его точная функция до сих пор неизвестна, как плохо известны сигнальные пути, в которых он участвует. Таким образом, являясь общепризнанным маркером наиболее агрессивной популяции опухолевых клеток, CD133 остается малоизученной молекулой, что делает работы, посвященные исследованию его молекулярных партнеров и регуляторов, крайне актуальными.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Системный обзор литературы: определение частоты использования CD133 в качестве маркера популяции РСК

Системный обзор литературы проводили с использованием корпуса оригинальных работ, в которых исследователи выделяли популяцию РСК с помощью одного или нескольких маркеров и подтверждали ее функциональные свойства с помощью *in vivo* тестов на иммунодефицитных мышах. В системном обзоре анализировали исключительно работы, выполненные на хирургическом материале от пациентов и описанные на английском языке. Для формирования исходного корпуса научных статей использовали текстовую базу данных PubMed. Поисковый запрос был следующим:

((stem[title/abstract] OR progenitor[title/abstract] OR initiating[title/abstract]) AND (cancer[title] OR tumor[title] OR tumour[title] OR carcinoma[title] OR malignancy[title] OR lymphoma[title] OR leukemia[title] OR melanoma[title] OR glioma[title] OR glioblastoma[title] OR astrocytoma[title] OR neuroblastoma[title] OR sarcoma[title])) AND ((nude[title/abstract] OR nsg[title/abstract] OR scid[title/abstract] OR immunodeficient[title/abstract] OR immunocompromised[title/abstract] OR immunodeficiency [title/abstract]) AND (mice[title/abstract] OR mouse[title/abstract])) NOT “cell line”[title/abstract] NOT “cell lines” [title/abstract].

Финальный корпус статей получали путем анализа и выбора работ исходного корпуса, которые полностью соответствовали поставленной задаче.

3.2. Культивирование клеточных линий

Все клеточные линии (**Таблица 1**) культивировали в полной среде, основанной на среде DMEM/F-12 (1:1), за исключением клеточной линии MB-231, основу среды которой составляла среда RPMI-1640. В качестве добавок для всех сред использовали коктейль, состоящий из 10% (v/v) FBS (для клеточной линии Caco2 – 20%), 2mM L-глутамина, 100 U/мл пенициллина и 10 мкг/мл

стрептомицина. Все клеточные линии культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂.

3.3. Проточная цитометрия и клеточная сортировка

После достижения конfluence в 70-90% клетки промывали три раза раствором Версена (Панэко, Россия) и открепляли от подложки с помощью обработки раствором аккутазы (Thermo Fisher Scientific, США), фермента, способствующему более деликатному откреплению клеток от подложки и соседних клеток. Инкубацию с ферментом проводили в течение 3 минут при 37 °C. Активность фермента нейтрализовали с помощью полной среды и далее клетки центрифугировали и ресуспендировали в среде DMEM/F-12 (1:1). Клетки окрашивали антителами anti-CD133-PE (клон AC-133, Miltenyi Biotec, Германия) в концентрации, рекомендованной производителем, в течение 30 минут, промывали дважды с помощью раствора PBS и сортировали или анализировали в среде DMEM/F-12 (1:1) без добавления FBS или BSA. Клеточную сортировку или анализ проводили на проточных цитофлуориметрах FACS Aria III или FACS Aria SORP (BD Bioscience, США), а полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения BD FACSDiva. Клеточный дебрис и агрегаты клеток исключали из анализа в координатах FSC-A/SSC-A и FSC-H/FSC-W соответственно. Изотипический и неокрашенный контроль включали в группу анализируемых образцов при каждом анализе и сортировке. Установку гейтов клеточных популяций, обогащенных и обедненных CD133 (далее CD133^{+/high} и CD133^{-/low}), проводили на основании изотипического контроля в случае анализа. Для сортировки клеток гейты для популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low} устанавливали таким образом, чтобы отношение их медиан интенсивности флуоресценций (далее МИФ) было не менее 10. В качестве референтного контроля (далее CD133^{ref}) сортировали общую популяцию живых единичных клеток. В случае цитометрического анализа популяцию мертвых клеток исключали на основании окраски витальным красителем 7-AAD (BD Bioscience, США) или Sytox Blue (Thermo Fisher Scientific, США). При необходимости последующего

культивирования клетки сортировали в полную среду, во всех остальных случаях клетки сортировали в среду DMEM/F-12 (1:1).

3.4. Проточная цитометрия с визуализацией

Проточную цитометрию с визуализацией проводили с использованием прибора Amnis ImageStreamX Mk II Imaging Flow Cytometer (Luminex Corporation, США). Программное обеспечение IDEAS использовали для последующего анализа данных. Клеточную суспензию готовили и окрашивали anti-CD133-PE антителами описанным выше методом (пункт 3.3), промывали в растворе PBS и фиксировали в 4% параформальдегиде в PBS. Ядра фиксированных клеток окрашивали растром Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США) в финальной концентрации 10 мкг/мл. Адаптированный алгоритм для подсчета митотического индекса (МИ), а также предварительная стратегия гейтирования приведены в параграфе 4.3.1. В каждом биологическом повторе анализировали не менее 10^5 клеток.

3.5. Иммунофлуоресцентная микроскопия

Суспензию клеток окрашенных антителами anti-CD133-PE или anti-CD133-VioBright FITC (клон REA753, Miltenyi Biotec, Германия) наносили на стеклянное дно чашки Петри и флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon Instruments Europe B.V., Япония), оснащенного камерой ORCA-Flash4.0 (Hamamatsu Photonics K.K., Япония), или инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer (ZEISS, Германия), оснащенного камерой ORCA-Flash 4.0 V2 (Hamamatsu Photonics K.K., Япония).

3.6. Сравнительный анализ времени удвоения клеточных популяций

Клеточные популяции CD133^{+/high} и CD133^{-/low} линий Caco2 и HT-29 высевали в шести технических повторах сразу после их сортировки в 12-луночный планшет в количестве по 5×10^3 и 1×10^4 клеток на лунку (для линий Caco2 и HT-29

соответственно). Цейтраферную съемку и анализ клеточного монослоя проводили на приборе Incucyte ZOOM (Essen BioScience, США) с увеличением объектива 10X (каждые 6 часов по 49 фазовых изображений на лунку). Анализ изображений проводили при следующих параметрах: «segmentation adjustment» – 1.2 и 0.4 (Caco2 и HT-29 соответственно), «hole fill» – 8000 мкм² (только для Caco2), «filters» – минимум 1000 и 250 мкм² (для Caco2 и HT-29 соответственно).

3.7. Краткосрочный клоногенный тест: подсчет митотического индекса

Клетки высевали квадрупликатами сразу после их сортировки в количестве по 1000 клеток в 40 мм чашки Петри. После 3 дней культивирования в стандартных условиях клетки промывали PBS и фиксировали 15 минут в растворе 4% параформальдегида в PBS. Фиксированные колонии хранили в 1% растворе параформальдегида при температуре 4°C. Непосредственно перед подсчетом митотического индекса (МИ) колонии окрашивали с помощью раствора 10 мкг/мл Hoechst 33342 в PBS и промывали PBS дважды. Подсчет митотического индекса (МИ) проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа. Все фигуры митозов, начиная от ранней профазы и заканчивая поздним цитокинезом, включали в подсчет МИ.

3.8. Долгосрочный клоногенный тест

Клетки высевали трипликатами после их сортировки в 6-луночный планшет в количестве по 300 клеток на лунку. Культивирование клеток проводили в стандартных условиях в течение 10 дней. Клетки промывали PBS и фиксировали в 4% растворе формальдегида в PBS в течение 15 минут. Колонии клеток окрашивали с помощью раствора кристаллического фиолетового (0.1% в 4% параформальдегиде в PBS) в течение 15 минут и аккуратно промывали под проточной водой. После просушивания в лунки добавляли по 2 мл раствора уксусной кислоты в дистиллированной воде (10% v/v) и кристаллический фиолетовый, растворяли при легком перемешивании в течении 20 минут.

Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре Tecan Infinite F50 (Tecan Trading AG, Швейцария) при длине волны 590 нанометров. Число и размер колоний в каждой лунке измеряли по предварительно сделанному снимку лунки с помощью программы OpenCFU (<http://opencfu.sourceforge.net>) с соответствующими параметрами: «cut off» – 10, «minimal radius» – 3. Для определения значимых отличий при сравнении общего количества клеток, числа и размера колоний в CD133^{+/high} и CD133^{-/low} клеточных популяциях был использован двусторонний критерий Стьюдента.

3.9. Выделение РНК

Отсортированные клетки (в количестве от 3×10^5 до 5×10^5) центрифугировали и лизировали в RLT буфере (RNeasy Micro Kit; Qiagen, Германия). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора RNeasy Micro Kit согласно инструкциям производителей. Качество РНК подтверждали с помощью анализа отношений поглощений раствора РНК (260/280 и 260/230 нм) на приборе NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США), а также с помощью капиллярного гель-электрофореза, проводимого на биоанализаторе Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument с использованием набора RNA 6000 Nano assay kit (Agilent Technologies, США). Образцы со значением RIN (RNA integrity number, значение целостности РНК) ниже 8 были исключены из дальнейшего исследования.

3.10. Сравнительный полнотранскриптомный анализ клеточных популяций

Процедуру синтеза кДНК и комплиментарной ей кРНК проводили с использованием набора Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit согласно рекомендациям производителей. Выделенную из клеток тотальную РНК использовали для построения кДНК, на основе которой синтезировали последовательности кРНК, включающие модифицированные Cy5 остатки цитидинтрифосфата (Cy5-CTP). Контрольную кРНК маркировали цитидинтрифосфатом, содержащим Cy3 флуоресцентную метку (Cy3-CTP).

Эффективность включения флуоресцентных нуклеотидов в цепь кРНК оценивали на приборе NanoDrop 1000. Для гибридизации проб с флуоресцентной меткой использовали полногеномные 4х44К микрочипы (G4112F), сканирование которых проводили на приборе G2565CA Microarray Scanner System, а полученные первичные данные обрабатывали с помощью программы Feature Extraction v10.10.1.1. Все расходные материалы, приборы и программное обеспечение, описанные в данном пункте, поставлялись компанией Agilent Technologies (США), если не указано иное. Для определения дифференциально экспрессируемых в клеточных популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low} транскриптов использовали опцию «Up and Down Identification» онлайн платформы GeneXplain (geneXplain GmbH, Германия) со следующими пороговыми значениями: «Кратность изменения» – 2, p-value – 0.05 с поправкой на множественное сравнение.

3.11. Подбор праймеров для ПЦР

Последовательности праймеров, использованные для ПЦР в реальном времени приведены в **приложении 1**. Дизайн праймеров для генов (KLF4, NANOG, BMI1, ABCB1, ALDH1A1, PROM1, ACTB, UBC) проводили на основании последовательностей генов, опубликованных на платформе PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), а также онлайн платформ UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>), использовавшейся для исключения неспецифических праймеров, и платформы Integrated DNA Technologies - OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>), использовавшейся для анализа температуры плавления праймеров и для исключения праймеров, склонных к образованию шпилек и димеризации.

Последовательности праймеров остальных генов (OCT4a, SOX2, MYC, ABCG2, HPRT) были найдены в специализированных базах данных: PrimerBank (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>), RTPrimerDB (<http://www.rtprimerdb.org>) и qPrimerDepot (<https://primerdepot.nci.nih.gov>). Синтез и ВЭЖХ-очистка праймеров проводили компании Евроген и Синтол.

3.12. ПЦР в реальном времени

Первую цепь кДНК синтезировали с использованием набора MMLV RT kit (Eurogen, Россия) согласно рекомендациям производителей. Реакцию ПЦР проводили в объеме 15 мкл с использованием набора EVA Green (Синтол, Россия). Финальные концентрации и количества составляющих реагентов реакции были следующими: x_1 – ПЦР буфер с интеркалятором EVA Green, хлорид магния – 1.5 mM, дНТФ – 2.5 mM, Taq-полимераза - 1.5 единицы, кДНК – от 10 до 50 мкг (в пересчете на исходную РНК), а также по 200 mM каждого праймера. Реакцию ПЦР проводили на приборе Stratagene Mx3005P с использованием программы MxPro QPCR Software и алгоритма SYBR Green (Agilent Technologies, США). Программа амплификации состояла из следующих шагов: первичная денатурация - 5 минут при 95°C, а) денатурация - 30 секунд при 95°C, б) отжиг праймеров - 30 секунд при 53°C, с) элонгация - 10 секунд. Шаги а - с повторялись на протяжении 40 циклов. Чистоту продуктов реакции анализировали с помощью кривой плавления ампликонов после финального цикла реакции ПЦР. Относительное изменение экспрессии генов рассчитывали с помощью формулы $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [Rao и др., 2013]. Нормализацию экспрессии генов проводили с помощью анализа экспрессии трех генов домашнего хозяйства: ACTB, HPRT, UBC. Для каждого из трех биологических повторов при определении значимых отличий в экспрессии изучаемых генов использовали двусторонний критерий Стьюдента. Поправку на множественные сравнения проводили с помощью процедуры Бенджамини-Хохберга (FDR = 0.05).

3.13. Сравнительный протеомный анализ клеточных популяций

Дифференциально экспрессируемые в клеточных популяциях белки определяли с помощью тандемной label-free масс-спектрометрии. Отсортированные клетки в количестве от 2×10^5 до 4×10^5 центрифугировали и лизировали в 50-100 μL буфера, приготовленного на основе бикарбоната триэтиламмония (75 mM) с добавлением 1% соли натрия дезоксихолевой кислоты и 5% ацетонитрила (pH 8.5). Фракцию белков ферментировали с помощью

трипсина высокой степени очистки (Promega Corporation, США). Хроматографическое разделение полученных пептидов проводили на аналитической колонке RSLC Acclaim PepMap C18 column (длина - 150 mm, внутренний диаметр - 75 μ m, диаметр зерна - 1.8 μ m, размер пор - 100Å). Последовательности пептидов анализировали на масс-спектрометре высокого разрешения Q Exactive (Thermo Scientific), а идентификацию белков проводили с использованием программы MASCOT (www.matrixscience.com). Белковые контаминанты исключали из финального списка объектов на основании списков распространенных контаминаций двух баз данных (http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_contaminants.html). Также из сравниваемых списков исключали белки, представленные только в одном из трех биологических повторов. Относительное количество каждого белка подсчитывали с помощью индекса emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index), нормализацию которого проводили на отношение геометрического среднего значимых пептидных совпадений. Белки с кратностью изменения больше 2 между группами CD133^{+/high} и CD133^{-/low} включали в финальный список дифференциально экспрессируемых белков.

3.14. In silico анализ дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков

Финальные списки дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков получали объединением списков up- и down-регулируемых транскриптов и белков для каждой клеточной линии отдельно. Финальные списки загружали на платформу GeneXplain (<https://genexplain.com/genexplain-platform>) и анализировали с помощью алгоритма «Full gene ontology classification» со следующими параметрами: «minimal hits to group» – 2, «p-value threshold» – 0.05. Далее полученные группы GO-терминов анализировали с помощью алгоритма «TreeMap on functional classification» (параметр «similarity» – 0.7).

3.15. In silico анализ молекулярных ключевых регуляторов CD133

Дифференциально экспрессирующиеся в популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low} транскрипты и белки отдельно комбинировали для каждой клеточной линии и загружали на платформу GeneXplain (<https://genexplain.com/genexplain-platform>). Списки транскрипционных факторов, регулирующих выборку изучаемых транскриптов и белков, получали при использовании алгоритма базы данных TRANSFAC со следующими пороговыми значениями: отношение Yes-No - 1.3, p-value – 0.05. Списки мастер-регуляторных молекул получали при использовании алгоритма базы данных TRANSPATH со следующими пороговыми значениями: «max radius» – 10, Score - 0.2, FDR – 0.05 и Z-score - 1.0.

3.16. Нокдаун генов с помощью лентивирусной трансдукции с помощью shRNA

shRNA против TRIM28 (NCBI Reference Sequence: NG_046945.1; **Приложение 1B**) клонировали между сайтами рестрикции BamHI и EcoRI вектора pGPV (Evrogen, Россия), содержащего репортерный ген сорGFP и ген устойчивости к канамицину. Трансфекцию клеток 293Т проводили с помощью фосфата кальция. Клетки контрансфицировали тремя плазмидами, взятыми в равных концентрациях в общей массе 20 мкг: 1) плазида с shRNA - pGPV, 2) плазида, несущая белок оболочки вируса - pCMV-VSV-G (plasmid #8454, Addgene, США), 3) упаковочная плазида - pCMV-dR8.2 dvpr (plasmid #8455, Addgene, США). Супернатант с вирусными частицами собирали через 24, 48 и 72 часа после трансфекции и концентрировали с помощью фильтра Amicon Ultra-15 100K (Millipore, США). Концентрат с вирусными частицами добавляли к клеткам Caco2 и через 3 дня начинали проводить селекцию трансдуцированных клеток с помощью пуромицина (6 мкг/мл). Эффективность трансдукции подтверждали цитометрически, анализируя экспрессию репортерного флуоресцентного белка сорGFP. Снижение экспрессии TRIM28 в результате трансдукции подтверждали с помощью вестерн блота. В качестве негативного контроля использовали последовательность shRNA против люциферазы светлячков.

3.17. Нокаут генов методом геномного редактирования с использованием CRISPR/CAS9

Три последовательности gRNA (**Приложение 1С**), направленные против TRIM28, выбирали с помощью платформы CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no>), исходя из следующих критериев: 1) выбранные gRNA обладали высоким потенциалом геномного редактирования (расчетная эффективность редактирования >50%); 2) расчетный уровень off-target эффектов был минимальным (отсутствие MM0, MM1 и MM2 off-target транскриптов); 3) последовательности gRNA локализовались внутри первого экзона гена TRIM28 или вблизи него (NCBI Reference Sequence: NG_046945.1). В случае если последовательность gRNA начиналась не с G, дополнительный G добавляли к ее 5'-концу для улучшения эффективности транскрипции с U6-промотора. В качестве негативного контроля использовали последовательность gRNA против tagRFP.

Все последовательности gRNA синтезировали (Evrogen, Россия) и клонировали в вектор PX458 (pSpCas9(BB)-2A-GFP, plasmid #48138; Addgene, США). Клетки Сасо2 котрансфицировали с помощью реагента Genjector-U (Molecta, Россия) одновременно тремя различными плазмидами, каждая из которых содержала свою последовательность gRNA против TRIM28. GFP-позитивные клетки (GFP – репортерный белок плазмиды PX458) сортировали через 2 дня после трансфекции и высевали в количестве 1 клетка на лунку в 96-луночную планшет. Нокаут TRIM28 анализировали с помощью вестерн блота.

3.18. Электрофорез в полиакриламидном геле и вестерн блот

Клеточный осадок, содержащий 1 млн клеток, лизировали в 50 мкл RIPA буфере (**Приложение 2А**). Концентрацию белка в лизате оценивали на приборе NanoDrop 1000 путем измерения поглощения раствора при 280 нм. Перед нанесением образца на полиакриламидный гель (ПААГ; 20 мкг белка на лунку; для образцов с нокаутом – не менее 20 мкг) к клеточному лизату добавляли буфер для

ПААГ (**Приложение 2В**). Разделение белков проводили в геле NuPAGE™ 10%, Bis-Tris, Mini Protein Gel (Thermo Fisher Scientific, США). Белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора Semi-Dry Blotter V10-SDB (Biostep, Германия). Мембраны инкубировали в блокирующем буфере (5% обезжиренного сухого молока, 0.05% Tween 20 в PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембраны инкубировали с моноклональными мышинными антителами anti-TRIM28 (разведение 1:1000; clone 20C1, ab22553, Abcam, Великобритания) или anti- α -тубулин (1:1000; clone DM1A, T6199, Sigma-Aldrich, США) в PBS-T (PBS с добавлением Tween 20) в течение 1 часа. Мембраны отмывали в PBS-T три раза и инкубировали со вторичными поликлональными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:6000; #12-349 Sigma-Aldrich, США) в течение получаса. Мембраны промывали четыре раза PBS-T и связанные вторичные антитела визуализировались с помощью раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина 1-Step Ultra TMB Blotting Solution (Thermo Fisher Scientific, США).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1. 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. С этой целью был проведен системный обзор англоязычной научной литературы. Поскольку основным признаком РСК является их способность инициировать опухоль в иммунодефицитных мышах, в анализ были включены только работы, описывающие такие эксперименты. При формировании запроса использовали синонимы слов «стволовой», «опухоль», «иммунодефицит» и др. (см. материалы и

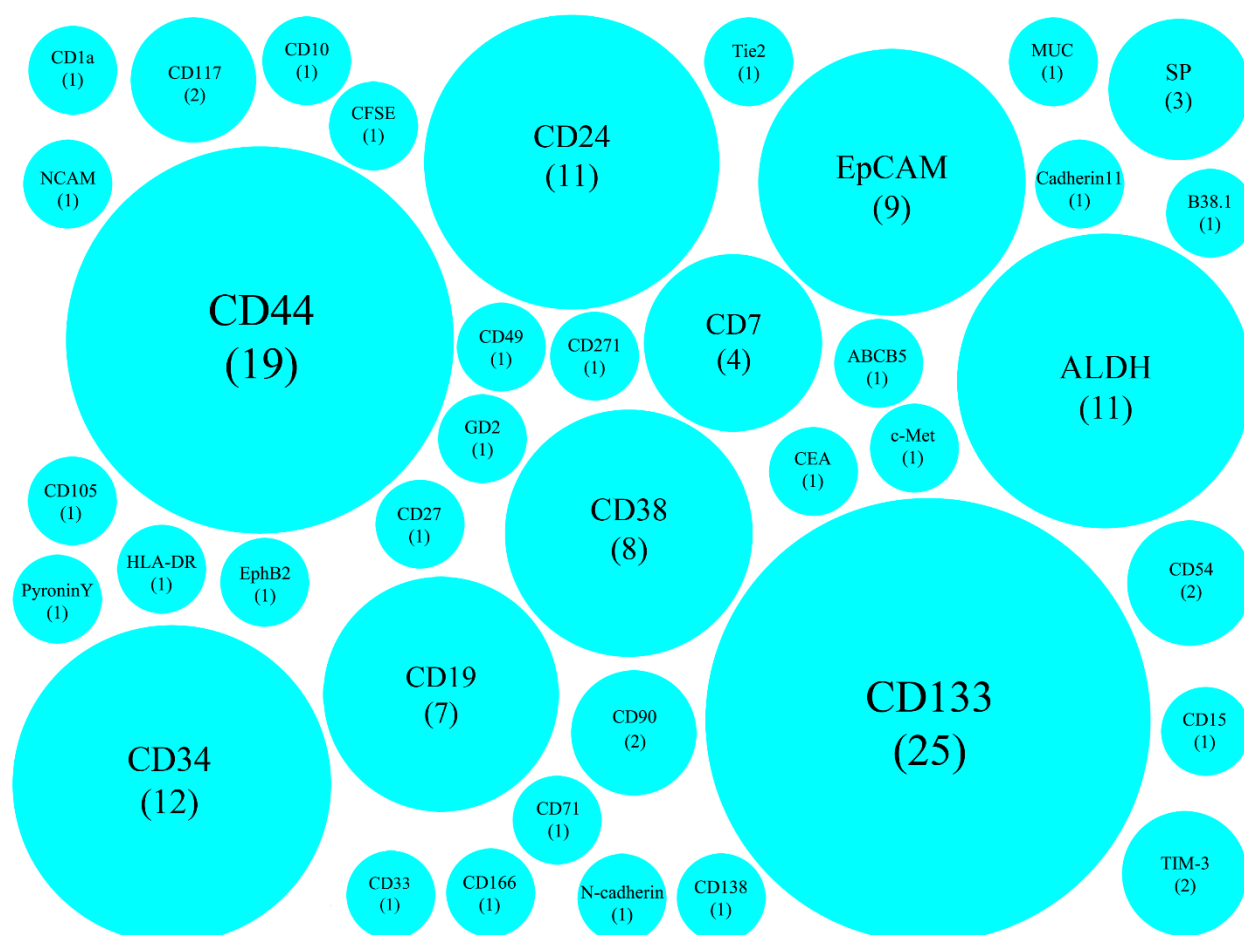


Рисунок 5. Маркеры РСК и количество оригинальных работ (номер в скобках), в которых эти маркеры использовали для выделения популяции РСК с последующим подтверждением ее свойств *in vivo*.

методы). Помимо этого, поисковый запрос исключал использование в работах клеточных линий и ограничивал выборку статей оригинальными работами. Первичная выборка статей включила в себя 768 работ, из которых мы отобрали для финальной выборки 97 статей, полностью отвечающих поставленным задачам.

Результаты системного обзора показали, что именно CD133 наиболее часто используется для выделения РСК из различных опухолей человека (25 работ; **Рисунок 5**), в первую очередь из опухолей нервной ткани и различных карцином (**Рисунок 6**). 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).

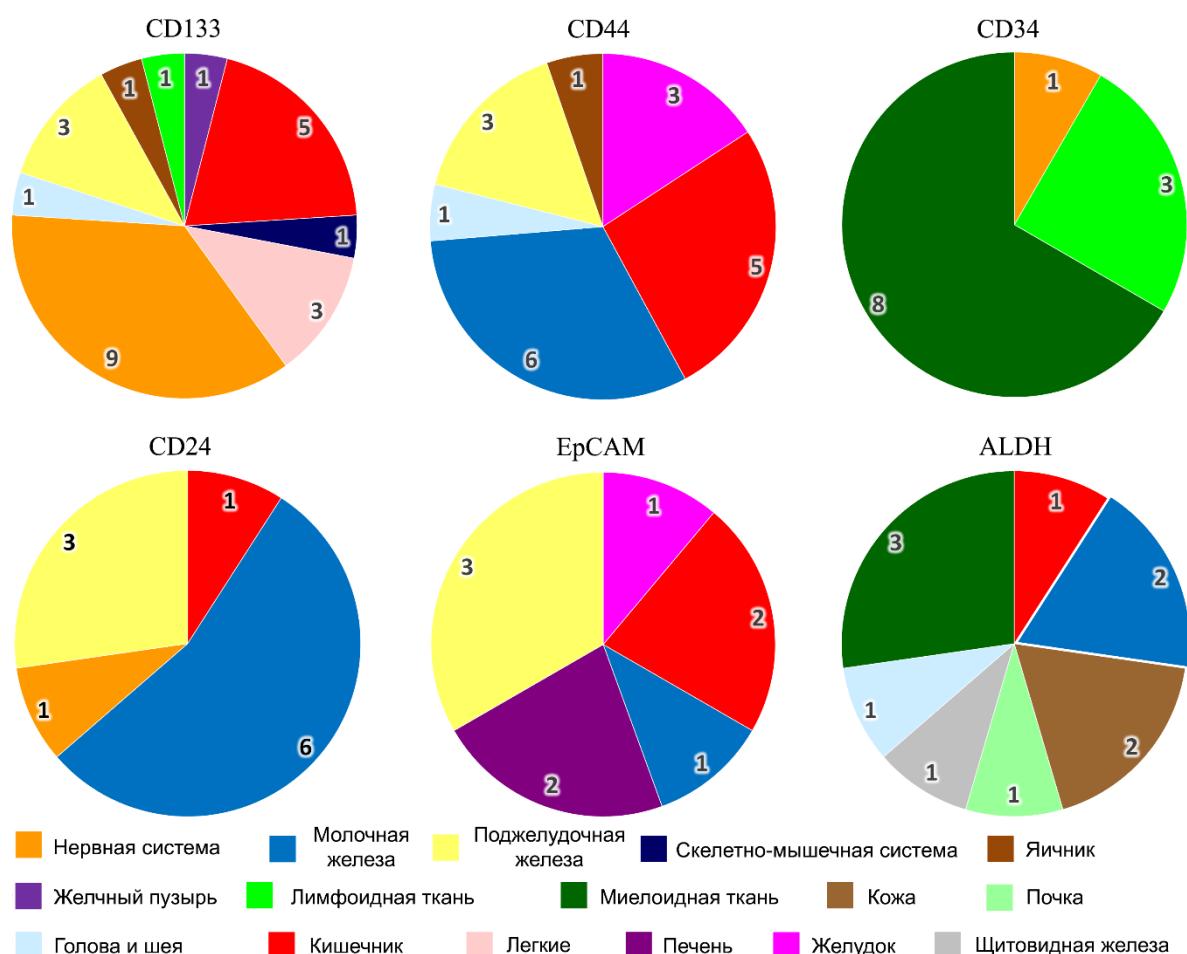


Рисунок 6. Маркеры РСК и количество оригинальных научных работ, в которых популяция РСК выделялась с их помощью из опухолей различных нозологий.

CD34 используется для выделения РСК практически исключительно из клеток гематологических опухолей, как миелоидного так и лимфоидного происхождения. CD24 используют чаще всего совместно с CD44 при выделении РСК из карцином молочной и поджелудочной желез. ЕpCAM – маркер не терминально дифференцированной эпителиальной ткани, используется для выделения РСК из различных карцином. Использование ALDH, в свою очередь, не имеет строгой тканевой специфичности: активность этого фермента используют для выделения РСК как из гематологических опухолей, так и из различных карцином и меланомы.

4.2. 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**). Группа включала в себя 5 клеточных линий немелкоклеточного рака легких, 5 линий колоректального рака, 3 линии глиобластомы, линии карциномы печени, почки, молочной, поджелудочной и щитовидной желез, а также линии остеосаркомы, фибросаркомы и нейблостомы.

Только четыре клеточные линии из двадцати одной имели популяцию CD133-положительных клеток – HT-29, Caco2, HUH7 и FTC-133. В результате анализа пяти биологических повторов процент CD133-положительных клеток в этих четырех клеточных линиях был следующим: HT-29 – $69.9\% \pm 21.8$, Caco2 – $99.7\% \pm 0.3$, HUH7 – $93.4\% \pm 4.4$, FTC-133 – $5.7\% \pm 4.1$. (**Таблица 1, Приложение 3**). Из четырех клеточных линий мы выбрали три, у которых объем CD133-положительной популяции был достаточно большим, для проведения дальнейших исследований (**Рисунок 7**). Две из них являлись клеточными линиями колоректального рака (HT-29 и Caco2), а одна клеточной линией гепатоклеточной карциномы (HUH7).

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	HUN7	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

Таким образом, по данным проточной цитометрии 17 клеточных линий не продемонстрировали в своем составе наличие CD133-положительной популяции. Для выборочного подтверждения данных цитометрии мы использовали две линии немелкоклеточного рака легких – A549 и H460, литературные данные об экспрессии CD133 в которых крайне противоречивы. Существуют работы,

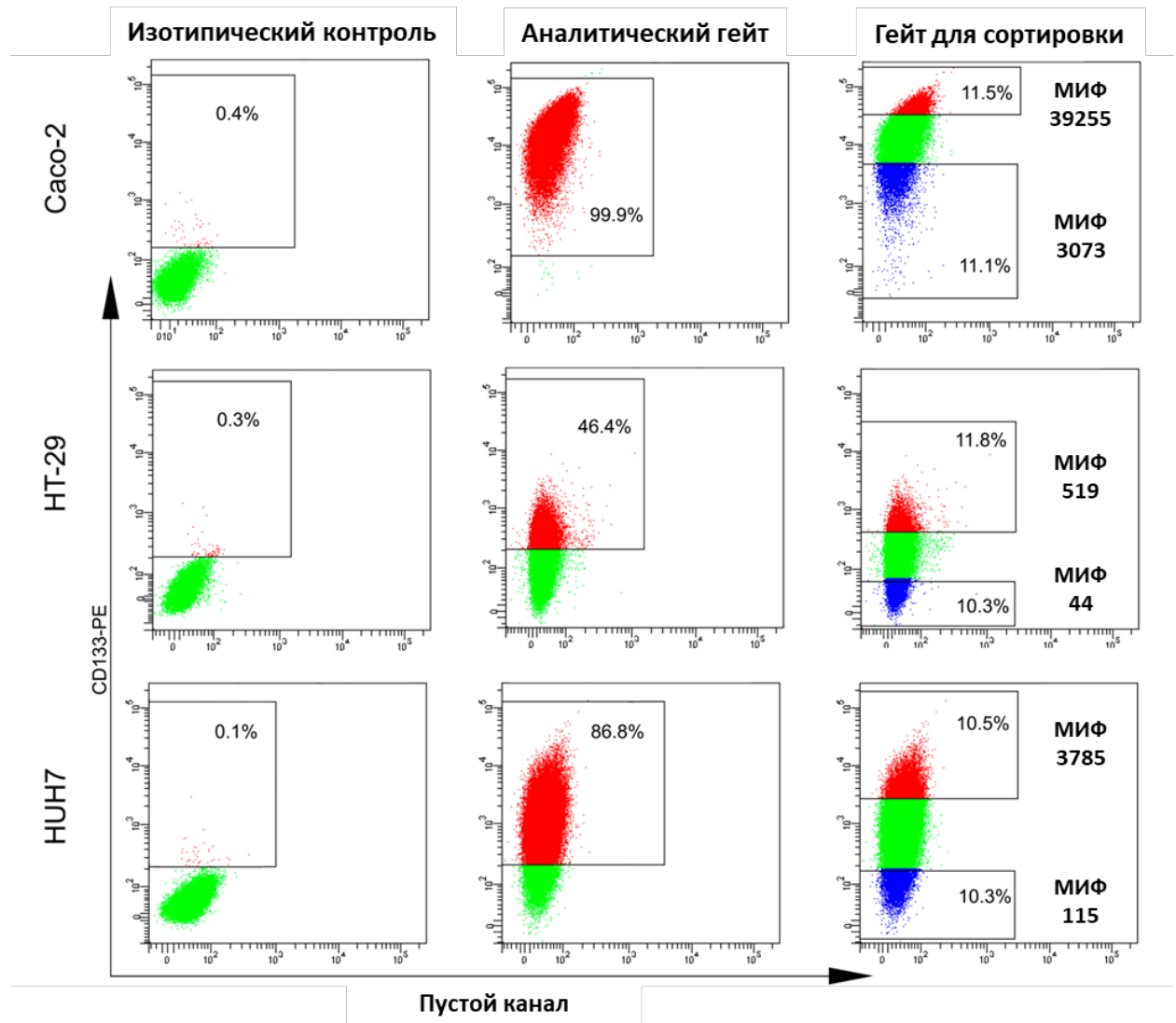


Рисунок 7. Цитометрический анализ экспрессии CD133 в клеточных линиях Caco2, HT-29 и HUH7, а также стратегия сортировки популяций CD133^{+/high} (красный гейт) и CD133^{-/low} (синий гейт). Левый столбец - изотипический контроль. Средний столбец - пример диаграммы экспрессии CD133 в трех клеточных линиях. 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.

демонстрирующие как наличие у них минорной CD133⁺ популяции, так и ее отсутствие [Bertolini и др., 2009; Shi и др., 2014]. Клетки, интенсивность флуоресценции которых хотя бы немного превышала изотипический контроль (0.1% клеток), были отсортированы (Приложение 3). В качестве положительного контроля использовали отсортированные на основании изотипического контроля

клетки линии НТ-29, а в качестве негативного интенсивность флуоресценции которых соответствовала изотипическому контролю. Флуоресцентная микроскопия показала, что большая часть клеток положительного контроля экспрессировала поверхностный CD133 и имела четкое мембранное окрашивание (492/500 клеток, 98.4%). Процент выявленных таким образом CD133⁺ клеток совпадал с процентом положительных клеток, определенных с помощью проточной цитометрии. На приведенных фотографиях видно, что истинно положительные по CD133 клетки имеют яркую мембранную флуоресценцию, тогда как ложноположительные по CD133 клетки, как и CD133-негативные клетки, имеют лишь очень слабую, равномерно распределенную по клетке аутофлуоресценцию (**Рисунок 8**). Ни одна из потенциально положительных по

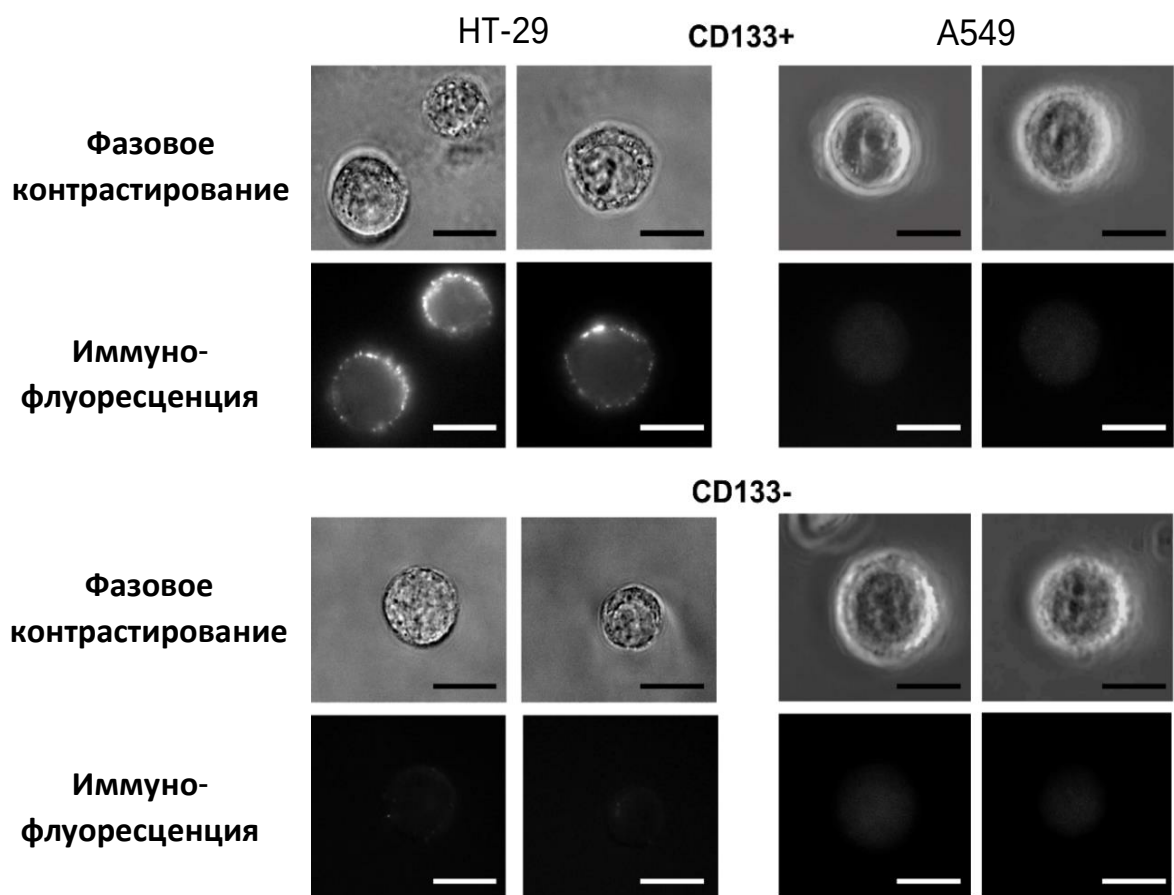


Рисунок 8. Верификация мембранного окрашивания anti-CD133-PE антителами клеток линий НТ-29 и А549 при помощи флуоресцентной микроскопии. Масштабная полоска – 10 мкм.

CD133 клеток не имела мембранного окрашивания как в случае линии A549 (0/500 клеток; **Рисунок 8**), так и в случае линии H460 (0/500 клеток). Таким образом, мы подтвердили, что клеточные линии A549 и H460 не имеют положительной по CD133 популяции клеток.

4.3. Функциональные особенности клеток с различным уровнем экспрессии CD133

Взаимосвязь между CD-фенотипом и функциональными свойствами клеток находится в центре внимания исследователей. Несмотря на то, что точная функция CD133 до сих пор неизвестна, существует большой спектр работ, 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]. Подобные исследования проводятся обычно на опухолевых клетках, полученных из хирургического материала от пациентов, однако, при использовании моделей *in vitro* также крайне важно продемонстрировать взаимосвязь между функциональной гетерогенностью и экспрессией изучаемого маркера. В связи с этим одной из наших задач стало сравнение функциональных особенностей клеток с различным уровнем экспрессии CD133 в выбранных клеточных линиях.

4.3.1. Сравнительный анализ митотического индекса клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133 методом проточной цитометрии с визуализацией

Изучение различий в функциональных свойствах клеток с разным уровнем экспрессии CD133 проводили на трех клеточных линиях: Caco2, HT-29 и HUH7. 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 (**Рисунок 9**). Первый и второй этапы адаптированного и исходного алгоритма совпадали: в начале мы выделяли клетки, находящиеся в фокусе, вслед за этим популяцию клеток-синглетов в координатах «Area» - «Aspect Ratio». Далее в адаптированном алгоритме мы пропускали выделение популяции клеток, находящихся в стадии G2/M, из-за анеуплоидности выбранных клеточных линий. Далее по той же причине выделение популяции клеток, находящихся в митозе, проводили исключительно по параметру «Bright Detail Intensity R3», игнорируя параметр «Area Threshold». Мы определяли митотические клетки как клетки с

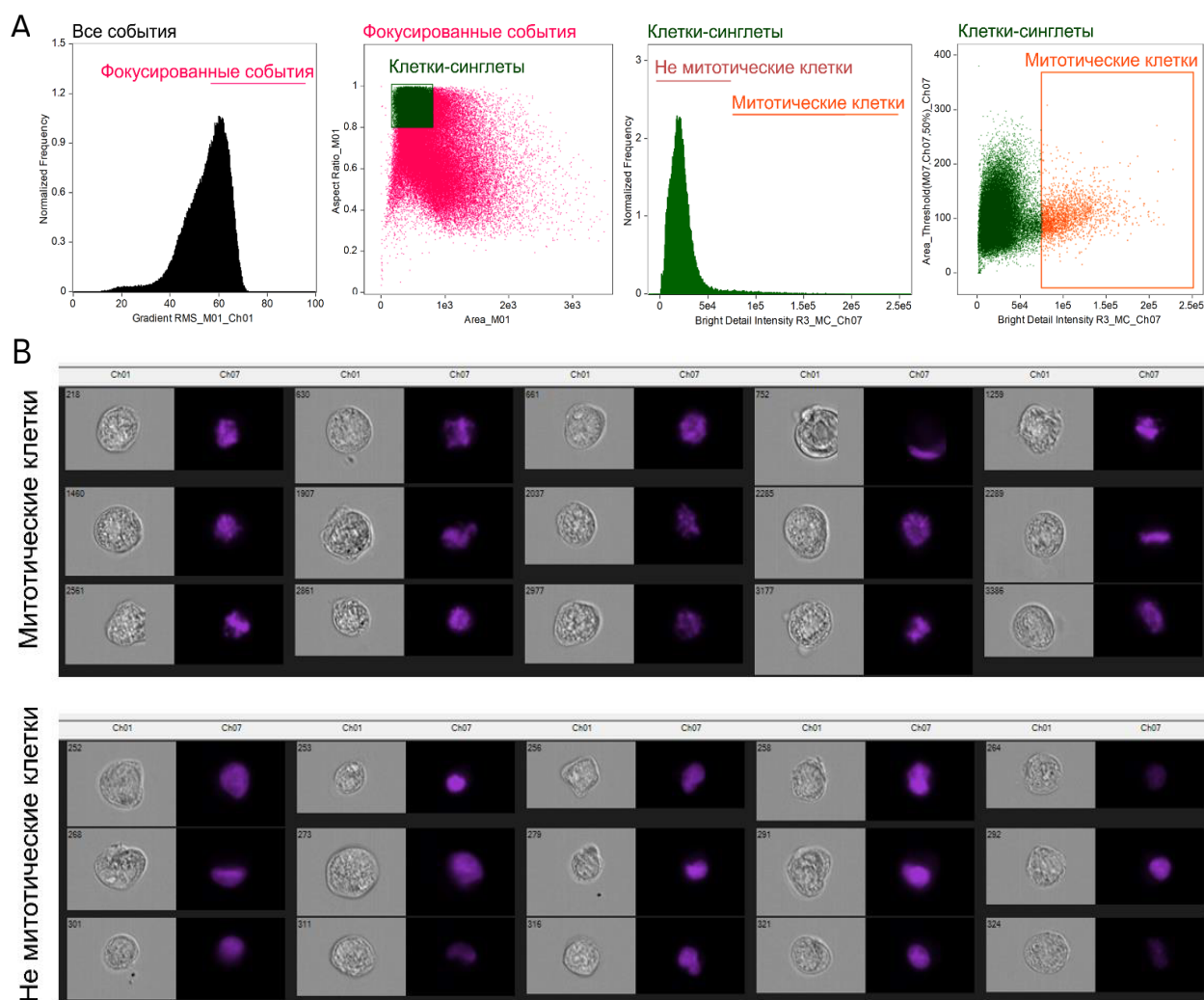


Рисунок 9. *A. Адаптированный алгоритм «Wizard Cell Cycle - Mitosis». B. Примеры изображений популяций митотических и не митотических клеток, выделенных с помощью адаптированного алгоритма «Wizard Cell Cycle - Mitosis».*

уровнем параметра «Bright Detail Intensity R3» на три стандартных отклонения выше от среднего значения.

Адаптированный алгоритм показал хорошую способность различать митотические клетки и клетки, не находящиеся в митозе. Так на **рисунке 9В** представлена случайная выборка изображений клеток и их ядер, выбранных из популяции митотических клеток (верхняя панель) и не митотических клеток (нижняя панель). В верхней панели представлены клетки, находящиеся преимущественно в различных фазах митоза, тогда как в нижней панели нет ни одного изображения с видимым митозом.

С помощью адаптированного алгоритма мы подсчитали МИ в клеточных популяциях $CD133^{+/high}$, $CD133^{-/low}$ и $CD133^{ref}$ линий Caco2, HT-29 и HUH7. Референтную популяцию клеток ($CD133^{ref}$) мы определяли как родительскую для групп $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ популяцию клеток-синглетов (**Рисунок 10**). При использовании метода проточной цитометрии с визуализацией мы определяли популяции $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ как клеточные популяции в 10 верхних и 10 нижних процентах на диаграмме распределения флуоресценции $CD133$ -PE. Непараметрический тест Краскала-Уолиса показал, что между МИ клеточных популяций $CD133^{+/high}$, $CD133^{-/low}$ и $CD133^{ref}$ всех трех клеточных линий есть статистически значимые отличия (Caco2: $H=15.92$, 2 d.f., $P=0.0003$; HT-29: $H=18.67$, 2 d.f., $P<0.0001$; HUH7: $H=19.01$, 2 d.f., $P<0.0001$). Тест для множественных сравнений Дана проводили *post hoc* для выявления статистических

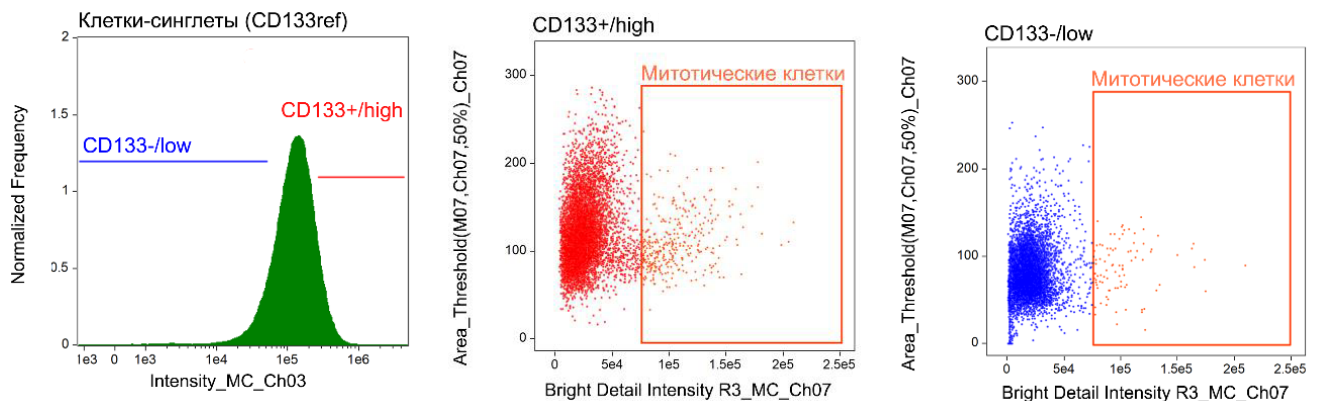


Рисунок 10. Гейтирование клеточных популяций $CD133^{+/high}$, $CD133^{-/low}$ и $CD133^{ref}$ при использовании проточной цитометрии с визуализацией.

различий между конкретными группами. Для все трех клеточных линий МИ популяции $CD133^{+/high}$ был значимо выше, чем МИ популяции $CD133^{-/low}$: кратность изменений были 2.0, 4.7 и 4.0 для линий Caco2, HT-29 и HUH7 соответственно (Рисунок 11А). Помимо этого, МИ популяции $CD133^{+/high}$ линий Caco2 и HUH7 был значимо выше, чем МИ популяции $CD133^{ref}$ (в 1.6 и 2.0 выше соответственно).

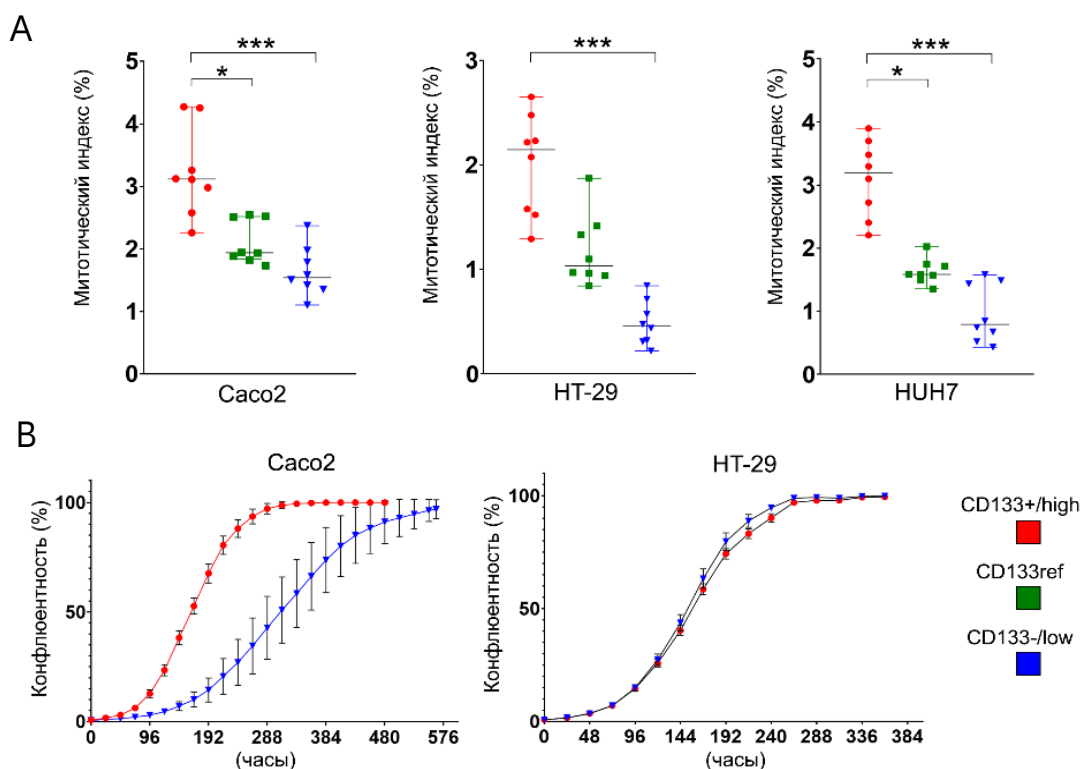


Рисунок 11. А. Измерение митотического индекса (МИ) в клеточных популяциях $CD133^{+/high}$, $CD133^{-/low}$ и $CD133^{ref}$ с помощью адаптированного алгоритма «Wizard Cell Cycle - Mitosis» (представлена медиана и диапазон, $n=8$). В. Кривые роста популяций $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ линий Caco2 и HT-29, полученные на основании цейтраферной фотосъемки (Caco2 $n=6$, HT-29 $n=5$; среднее $\pm$ SD).

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

4.3.2. Сравнительный анализ времени удвоения клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133

Также мы провели сравнение времени, необходимого для заполнения полного клеточного монослоя клетками популяций $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ линий Caco2 и HT-29 с использованием цейтраферной фотосъемки. Клетки линии HUH7

оказались неспособны к росту в редких колониях, поэтому в данном тесте мы исключили их из анализа. Клетки популяции CD133^{+/high} линии Caco2 достигали монослоя существенно быстрее, нежели клетки популяции CD133^{-/low} - 12 и 23,5 дней соответственно. Поскольку время удвоения клеточной культуры прямо пропорционально продолжительности культивирования и обратно пропорционально натуральному логарифму отношения финальной концентрации клеток к исходной (равных для популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low}), то отношение времени удвоения культур CD133^{+/high} и CD133^{-/low} будет равно отношению продолжительности культивирования до полного клеточного монослоя. Таким образом, время удвоения культуры CD133^{+/high} практически в два раза меньше нежели культуры CD133^{-/low} для линии Caco2 (**Рисунок 11В**). Для линии HT-29 мы не смогли показать различия во времени удвоения популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low}. Обе культуры достигали монослоя за 11 дней.

4.3.3. Сравнительный анализ митотического индекса популяций и размера колоний, полученных из клеток с различным уровнем экспрессии CD133 при краткосрочном культивировании

Поскольку способность к росту в колониях может отличаться от обычной пролиферации, мы провели подсчет МИ в колониях, полученных из клеток CD133^{+/high}, CD133^{-/low} и CD133^{ref} популяций. Так как количество клеток в колониях с каждым делением увеличивается в геометрической прогрессии, то уже на десятый день культивирования одна клетка может дать начало колонии из нескольких тысяч клеток, что может затруднять подсчет МИ. Так фигуры митозов в больших колониях обычно располагаются на ее периферии. Поэтому было решено провести анализ МИ в трехдневных колониях, средний размер которых обычно не превышает 10 клеток для изучаемых линий. В клеточных линиях Caco2 и HT-29 мы подсчитали МИ в 3000 и 3300 колониях соответственно. Параллельно с этим подсчитали средний размер колоний, измеряемый в клетках.

Односторонний анализ ANOVA показал наличие статистически значимых отличий МИ (Caco2: $F(2,6)=5.854$, $P=0.039$; HT-29: $F(2,6)=29.59$, $P=0.0008$) и

размера колоний (Caco2: $F(2,6)=6.171$, $P=0.035$; HT-29: $F(2,6)=17.15$, $P=0.0033$) между тремя группами для обеих клеточных линий. Последующее попарное сравнение групп с использованием критерия Ньюмена-Кейлса выявило, что для обеих клеточных линий различие МИ в группах $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ было достоверным (**Рисунок 12**). Так отношение МИ в группах $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ для линий Caco2 и HT-29 было соответственно 1.4 и 1.7. Также достоверное отличие в МИ мы показали для групп $CD133^{+/high}$ и $CD133^{ref}$ линии HT-29: для этих

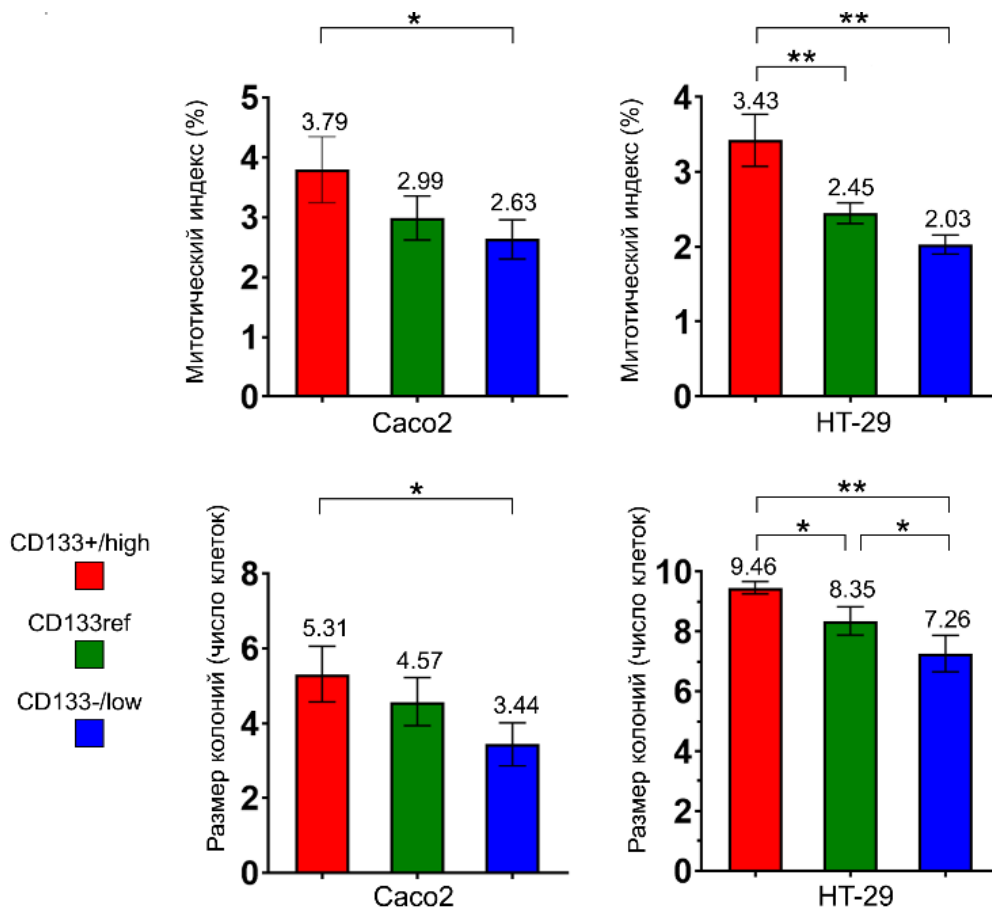


Рисунок 12. Измерение митотического индекса (верхний ряд) и размера колоний (нижний ряд), полученных из клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133.

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

групп отношение МИ было 1.4. 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 12**). Так отношение средних размеров колоний для групп $CD133^{+/high}$ и $CD133^{-/low}$ было 1.3, для групп $CD133^{+/high}$

и CD133^{ref} было 1.1, для групп CD133^{ref} и CD133^{-low} было 1.15. Для клеточной линии Сасо2 единственное достоверное отличие было показано для групп CD133^{+high} и CD133^{-low}, отношение средних размеров колоний которых было 1.5. Отсутствие значимых различий между остальными парами групп для линии Сасо2, возможно, объясняется большим разбросом в размерах колоний этой линии.

Таким образом, нами было показано, что клетки линий НТ-29 и Сасо2, которые имеют более высокий уровень экспрессии CD133, дают начало колониям больших размеров и с большим митотическим индексом, нежели клетки с более низким уровнем экспрессии CD133. Тем самым мы подтвердили результаты о различии в пролиферативной активности клеток с различной экспрессией CD133, полученные с помощью проточной цитометрии с визуализацией.

4.3.4. Сравнительный анализ клоногенных и пролиферативных свойств клеток с различным уровнем экспрессии CD133

Общее количество клеток в колониях определяли фотометрически по количеству экстрагированного из них кристаллического фиолетового, который обратимо связывается с белками и ДНК пропорционально количеству клеток. В трех биологических повторах среднее значение отношения количества клеток в группе CD133^{+high} к группе CD133^{-low} было 2.4 для линии Сасо2 и 2.2 для линии НТ-29 (**Рисунок 13А, В**). Важно отметить, что свой вклад в наблюдаемое различие общего количества клеток в исследуемых группах внесли как различие в пролиферативной активности, так и различие в клоногенной активности клеток популяций CD133^{+high} и CD133^{-low}. Для определения количества и размера колоний мы использовали программу OpenCFU. Клетки популяции CD133^{+high} линии Сасо2 сформировали в среднем в 1.9 раза больше колоний, нежели клетки популяции CD133^{-low} (**Рисунок 13С**). Для клеточной линии НТ-29 среднее отношений составило 1.5. Помимо этого, колонии, полученные из клеток популяций CD133^{+high} были в среднем больше колоний, полученных из клеток популяции, CD133^{-low} в 1.8 раз для линии Сасо2 и в 1.6 раза для клеточной линии НТ-29 (**Рисунок 13D**).

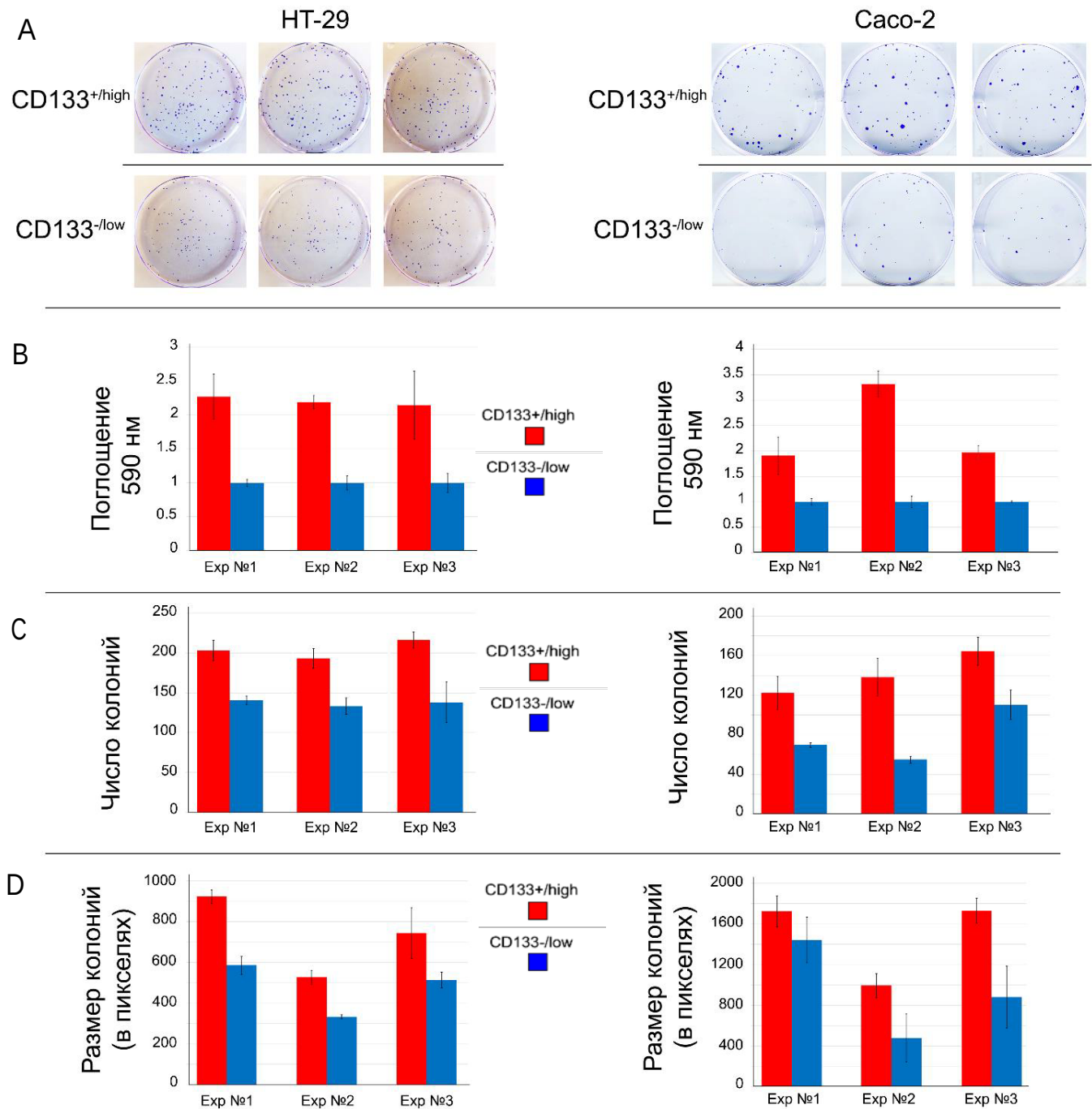


Рисунок 13. Сравнительный клоногенный тест для клеток CD133^{+/high} и CD133^{-/low}. **A.** Примеры 6-лучновых ячеек с колониями, полученными из 300 отсортированных клеток, после их окрашивания кристаллическим фиолетовым. **B.** Величина светопоглощения, характеризующая общее количество клеток на ячейку после культивирования. Представлены данные трех биологических повторов. В каждом биологическом повторе нормализация шла на меньшее значение поглощения. **C.** Число полученных колоний. Представлены данные трех биологических повторов. **D.** Средний размер колоний, полученных из клеток с разным фенотипом CD133. Представлены данные трех биологических повторов.

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, проведенных на иммунодефицитных мышах, которые демонстрируют повышенную пролиферативную и клоногенную активность CD133-сверхэкспрессирующих РСК (см. параграф 4.1).

4.4. 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 экспрессируемых транскриптов и белков клеточных популяций CD133^{+/high} и CD133^{-/low} линий Сасо2, НТ-29 и НУН7 мы использовали методы полно-транскриптомного 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 (**Приложение 4**). Дифференциальная экспрессия COTL1 и PRSS23 была показана в двух клеточных линиях: они сверхэкспрессировались в клеточной популяции CD133^{+/high} линии Сасо2 и CD133^{-/low} популяции линии НУН7.

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

HT-29 и 1565 для линии HUN7. 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 HUN7 (**Приложение 4**). Мы не нашли ни одного общего для всех трех клеточных линий дифференциально экспрессирующегося белка. Семь дифференциально экспрессирующихся белков были общими для двух клеточных линий из трех: TMED9, VCL, RPS17, RPS19, RAB7A, TLN1, DBI.

4.5. 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 и наличия в них стволовой программы. 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 девять генов. Пять из них кодируют транскрипционные факторы, ответственные за сохранение недифференцированного состояния клетки: OCT4a, SOX2, KLF4, c-MYC и NANOG [Feng, Wen, 2015; Pan, Thomson, 2007; Pan и др., 2002; Shi, Ai, 2013; Wilson и др., 2004]. Три гена кодируют белки-транспортеры ABCB1 и ABCG2, а также фермент ALDH1A1, ответственные за повышенную устойчивость СК к различным химическим веществам [Jia и др., 2013b; Landen и др., 2010; Sugano и др., 2015]. И последним мы выбрали BMI-1 – белок, который отвечает за самообновление стволовой популяции клеток [Park, Morrison, 2004]. Экспрессию транскрипта CD133 использовали как положительный контроль. В качестве генов «домашнего хозяйства» были проанализированы три гена: *ACTB*, *HPRT*, *UBC*. Последовательности праймеров для всех вышеперечисленных генов приведены в **приложении 1**. Исходя из результатов предварительных экспериментов, для нормализации экспрессии транскриптов в популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low} клеточной линии HT-29 использовали гены *ACTB* и *HPRT*, в случае клеточной

линии Сасо2 – ген *HPRT*. Ни один из трех проверенных генов не подходил для нормализации в случае HUN7, в связи с чем нормализацию проводили на количество взятой в реакцию кДНК.

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. Среднее значение кратности изменения уровня транскриптов в группе CD133^{+high} к группе CD133^{-low} были следующими: для линии HT-29 – 5.9, для линии Сасо2 – 2.6 и для линии HUN7 – 18.9. Интересно, что экспрессию транскрипта CD133 мы обнаружили даже в отрицательной по CD133 клеточной популяции линии HT-29. Возможно экспрессия гена CD133 может проходить на уровне мРНК, но подавляться на уровне белка. Остальные проанализированные гены не имели дифференциальной экспрессии ни в одной из клеточных линий.

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 – Сасо2, HT-29 и HUN7.

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

Поскольку мы не нашли молекулярные сигнатуры нормальных СК в профилях дифференциально экспрессируемых транскриптов и белков, было интересно установить, в какие общие группы попадают найденные дифференциально экспрессирующиеся гены на основании их молекулярных функций и принадлежности к определенному клеточному компартменту.

В результате полнотранскриптомного анализа и протеомного профилирования были получены шесть групп дифференциально экспрессирующихся генов – по одной группе транскриптов и белков для каждой из трех клеточных линий: Сасо2, HT-29 и HUN7. В каждой клеточной линии мы отдельно объединили транскрипты и белки с повышенной экспрессией в популяциях CD133^{+high} и CD133^{-low}.

С помощью анализа «Gene ontology» на платформе GeneXplain с последующей кластеризацией найденных терминов при помощи алгоритма «TreeMap functional classification» мы нашли 2 общих мета-термина в группе «биологические процессы» и 5 общих мета-терминов в группе «клеточные компоненты» (**Рисунок 14**).

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 экспрессируемых генов.

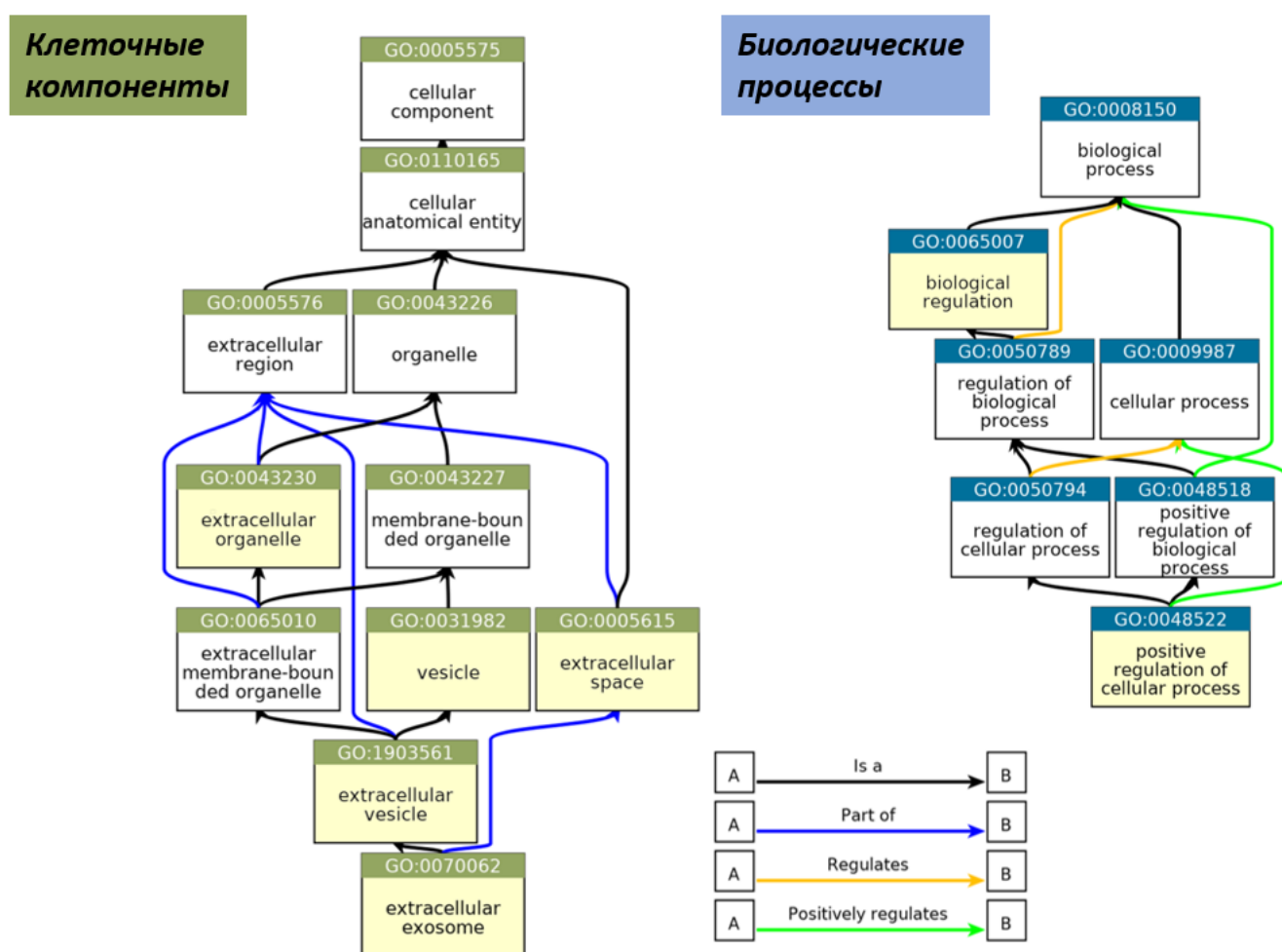


Рисунок 14. Термины классификации «Gene ontology», общие для всех шести списков дифференциально экспрессирующихся генов (выделены желтым). Схема сделана с помощью браузера «QuickGO» (ebi.ac.uk/QuickGO).

4.7. *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 (**Рисунок15**). Подход основывался на использовании базы данных TRANSFAC для поиска

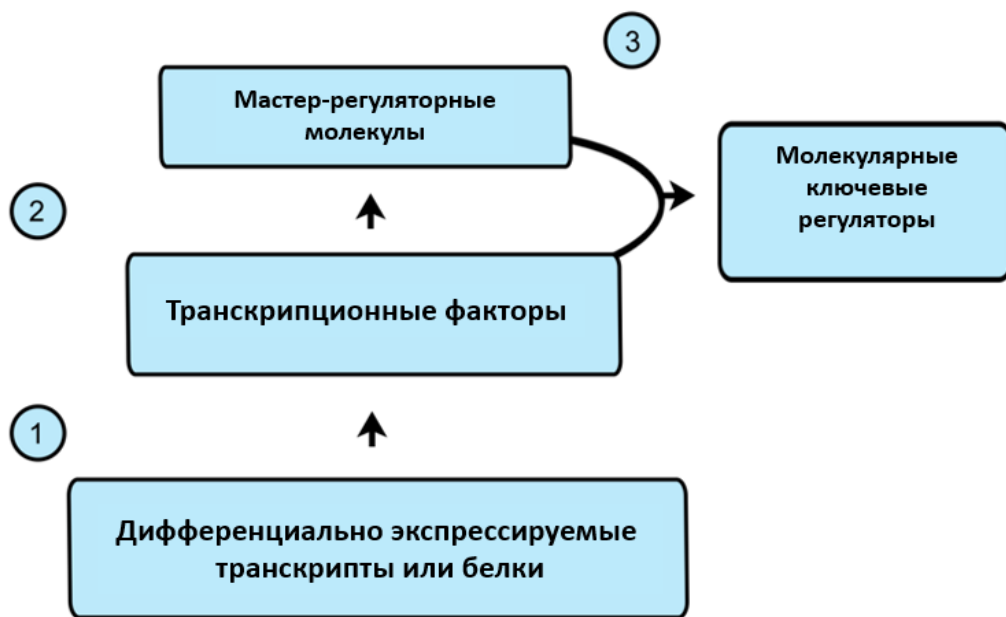


Рисунок 15. Алгоритм получения списка ключевых молекулярных регуляторов CD133 с помощью платформы GeneXplain.

кандидатных транскрипционных факторов (TFs), лежащих в основе работы анализируемой группы генов (1). База данных TRANSPATH использовалась для 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).

Число уникальных TFs и MRs для группы транскриптов было соответственно: 99 и 21 для Caco2, 50 и 64 для HT-29, 87 и 74 для HUH7. Соответствующее количество TFs и MRs для группы белков было: 52 и 17 для Caco2, 83 и 29 для HT-29, 52 и 39 для HUH7. Из дальнейшего анализа были удалены TFs и MRs, присутствующие только в одном из шести списков. В итоге мы получили 117 уникальных TFs и 57 уникальных MRs (**Приложение 5**). Финальный лист KRs состоял из 16 генов (**Таблица 2**).

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

Для выявления наиболее значимых объектов из полученных списков TFs, MRs и KRs была использована система ранжирования, которая основывалась на частоте 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. Для примера, NANOG был показан в качестве ассоциированной с экспрессией CD133 молекулы в двух из шести списков TFs и двух из шести списков MRs, таким образом, он получил 4 бала.

Наибольший ранг в списке TFs имели GCM2 с 6 балами и TRIM28, RELA, IKZF1, KLF6 каждый с 5 балами (**Приложение 5**). Остальные 112 TFs имели от 2 до 4 балов. TRIM28 (также известный как KAP1

и TIF1-β) обладал наибольшим балом среди списка MRs -5 баллов, MYB имел 4 бала, а 55 остальных MRs от двух до трех.

Путем суммирования рангов объектов в финальных списках TFs и MRs были получены ранги для списка KRs. 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).

Таким образом, мы предсказали потенциальную вовлеченность 16 белков в регуляцию CD133. Интересно, что дифференциальная экспрессия ни одного из них не была выявлена в клетках CD133^{+/high} и CD133^{-/low} ни в одной из трех клеточных линий. Мы выбрали KR с максимальным рангом – TRIM28 для верификации его участия в регуляции CD133 путем подавления его экспрессии в клетках.

4.8. Проверка гипотезы об участии TRIM28 в регуляции экспрессии CD133 с помощью shRNA инициированного нокдауна

Для определения влияния TRIM28 на экспрессию CD133 мы решили получить клетки со стабильным нокдауном TRIM28. Для этого была выбрана линия Сасо2, 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% (Приложение 6), и успешное подавление TRIM28 (Рисунок 16А), изменений в уровне экспрессии мембранного CD133 обнаружено не было (Рисунок 16В, Приложение 6). 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.

4.9. Проверка гипотезы об участии TRIM28 в регуляции экспрессии CD133 с помощью нокаута, инициированного CRISPR/CAS9

Для получения нокаута по TRIM28 с помощью CRISPR/CAS9 мы также использовали клеточную линию Сасо2. В результате трансфекции было получено: 11 клонов Сасо2, в которых успешно прошел нокаут TRIM28 (группа «КО»); 19

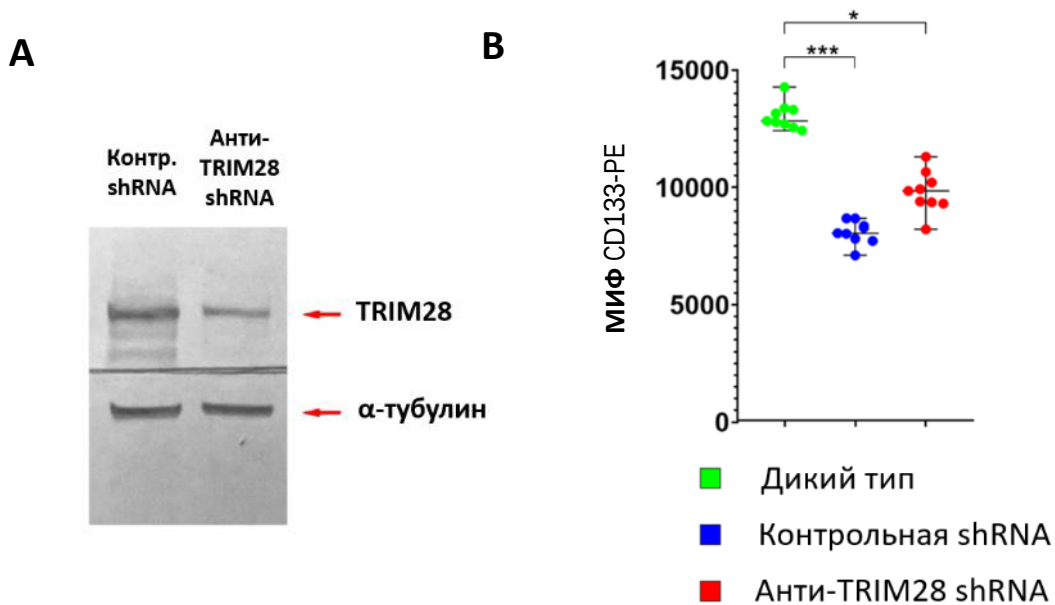


Рисунок 16. Нокаун TRIM28 в клетках Caco2. **А.** Экспрессия TRIM28 после лентивирусной трансдукции anti-TRIM28 shRNA (вестерн блот). **В.** Медиана интенсивности флуоресценции (МИФ) anti-CD133-PE антител, измеренная методом проточной цитометрии в клеточной линии Caco2, трансдуцированной anti-TRIM28 shRNA или контрольной shRNA против люциферазы (n=9).

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

клонов Caco2, которые подвергались процедуре геномного редактирования, но в которых нокаут TRIM28 не прошел по тем или иным причинам (группа «Failed KO»); 10 референтных клонов, которые подвергались геномному редактированию методом CRISPR/CAS9 трансфекции, нацеленному на ген tagRFP, которого нет в геноме млекопитающих (группа «Ref KO»); 11 клонов Caco2, которые не подвергались CRISPR/CAS9-редактированию вовсе (группа «Clones»). Экспрессия гена TRIM28 на уровне белка подтверждалась с помощью вестерн блота во всех случаях (**Приложение 7**). Уровень экспрессии CD133 измеряли с помощью проточной цитометрии. Тест Краскала-Уолиса показал, что между пятью тестируемыми группами есть статистически значимые различия ($H=31.5$, 4 d.f., $P<0.0001$); тест Дана, проведенный *post hoc*, выявил, что уровень экспрессии CD133 в клетках группы КО достоверно ниже, нежели уровень экспрессии CD133 в каждой из четырех остальных групп (**Рисунок 17**, **Рисунок 18**).

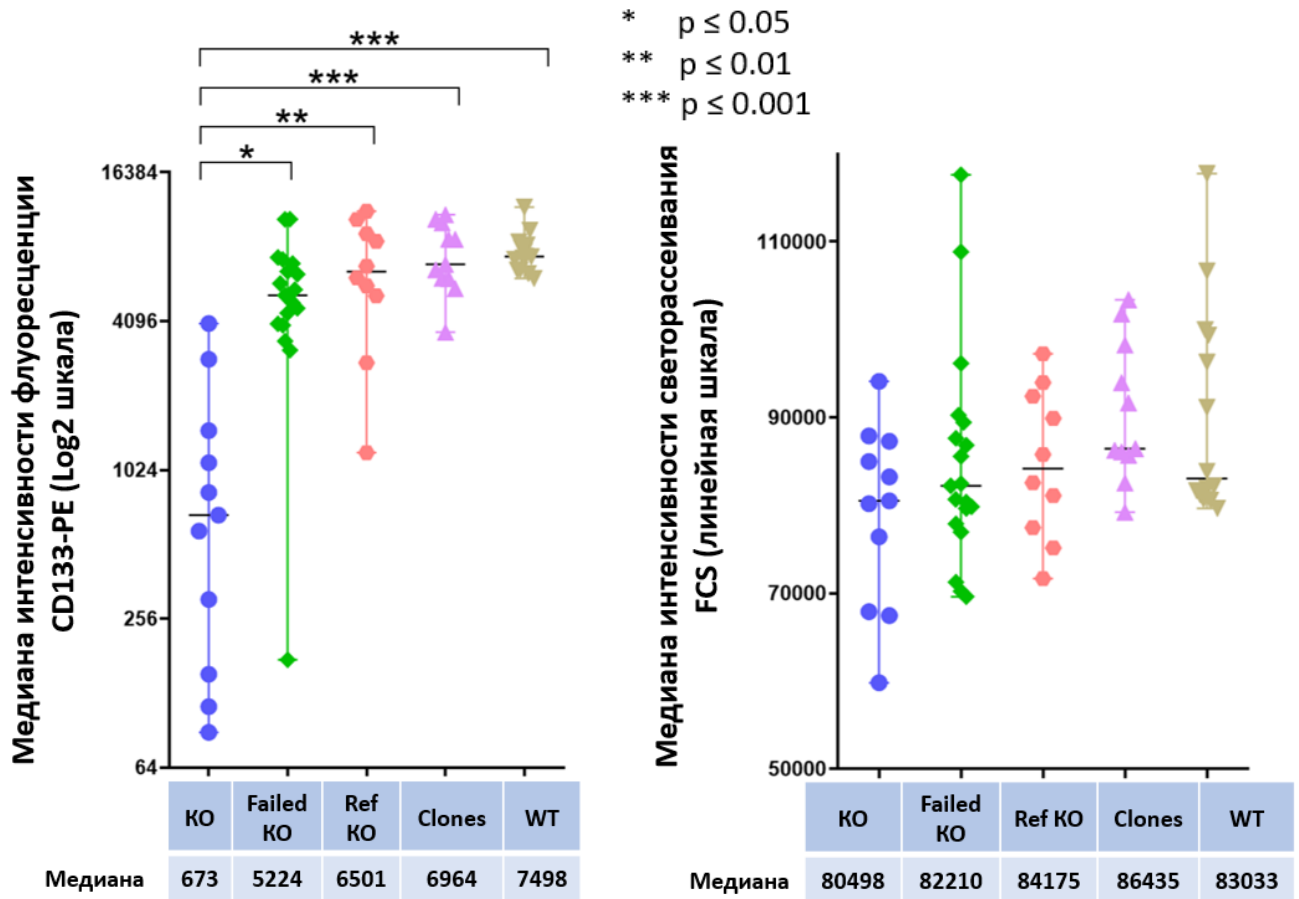


Рисунок 17. Результаты цитометрического анализа, показывающие снижение экспрессии CD133 в результате нокаута TRIM28. Левая диаграмма – медиана интенсивности флуоресценции (МИФ) anti-CD133-PE антител на клетках Saso2 с полным нокаутом TRIM28 и четырех группах негативного контроля (шкала Log2). Правая диаграмма – прямое светорассеяние (FCS) клеток Saso2 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 Saso2, не подвергшиеся действию геномного редактирования ($n=11$); «WT» - дикий тип, клеточная линия Saso2 ($n=14$).

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

Так кратность изменения МИФ в группе «KO» 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 17**). Тест Краскала-Уолиса не показал статистически значимых различий между прямым светорассеянием всех пяти изучаемых групп ($H=7.963$, 4 d.f., $P=0.092$). Следовательно, снижение экспрессии CD133 не является результатом уменьшения размера клеточной поверхности.

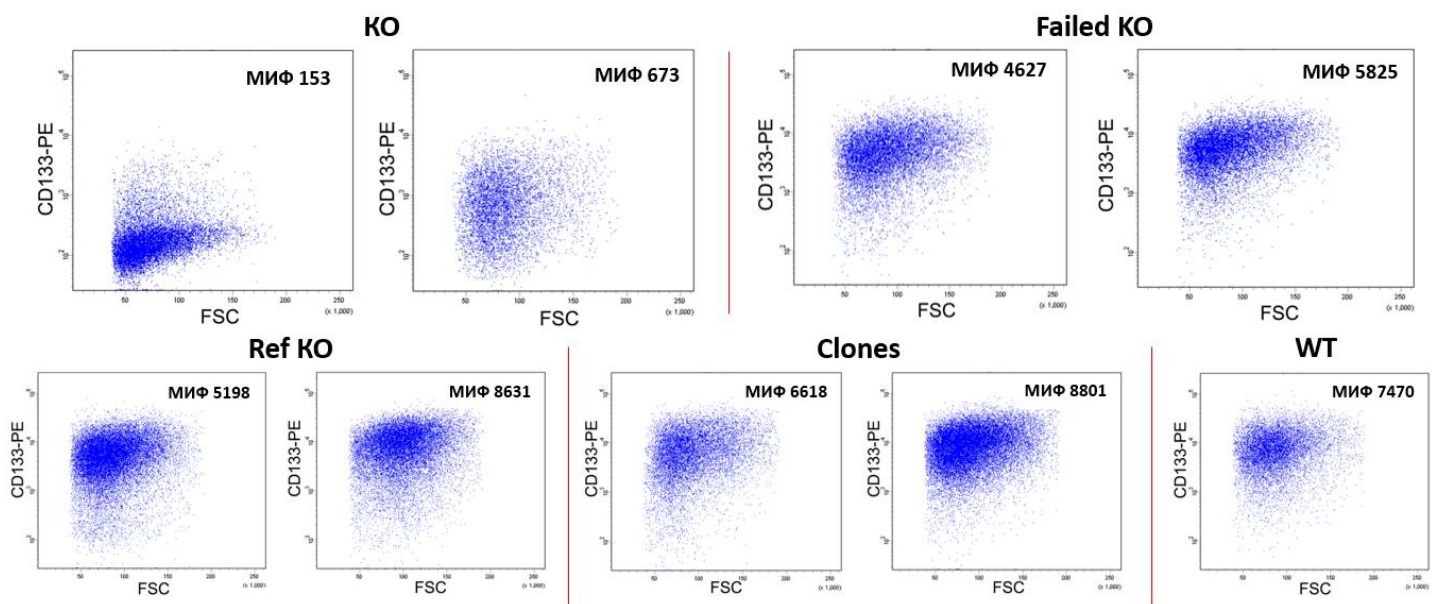


Рисунок 18. Примеры точечных диаграмм, иллюстрирующих результаты цитометрического анализа экспрессии CD133 в изучаемых группах клеток.

В дополнение к проточной цитометрии мы подтвердили эффект нокаута TRIM28 на экспрессию CD133 с помощью флуоресцентной микроскопии на нескольких клонах. Так экспрессия CD133 в TRIM28 KO клоне 5 существенно снизилась по сравнению с экспрессией в Caco2 дикого типа, а в случае клона 7 исчезла полностью (**Рисунок 19**).

Таким образом, мы показали, что TRIM28 является молекулярным регулятором CD133 и может участвовать в формировании ассоциированной с экспрессией CD133 клеточной внутриопухолевой гетерогенности.

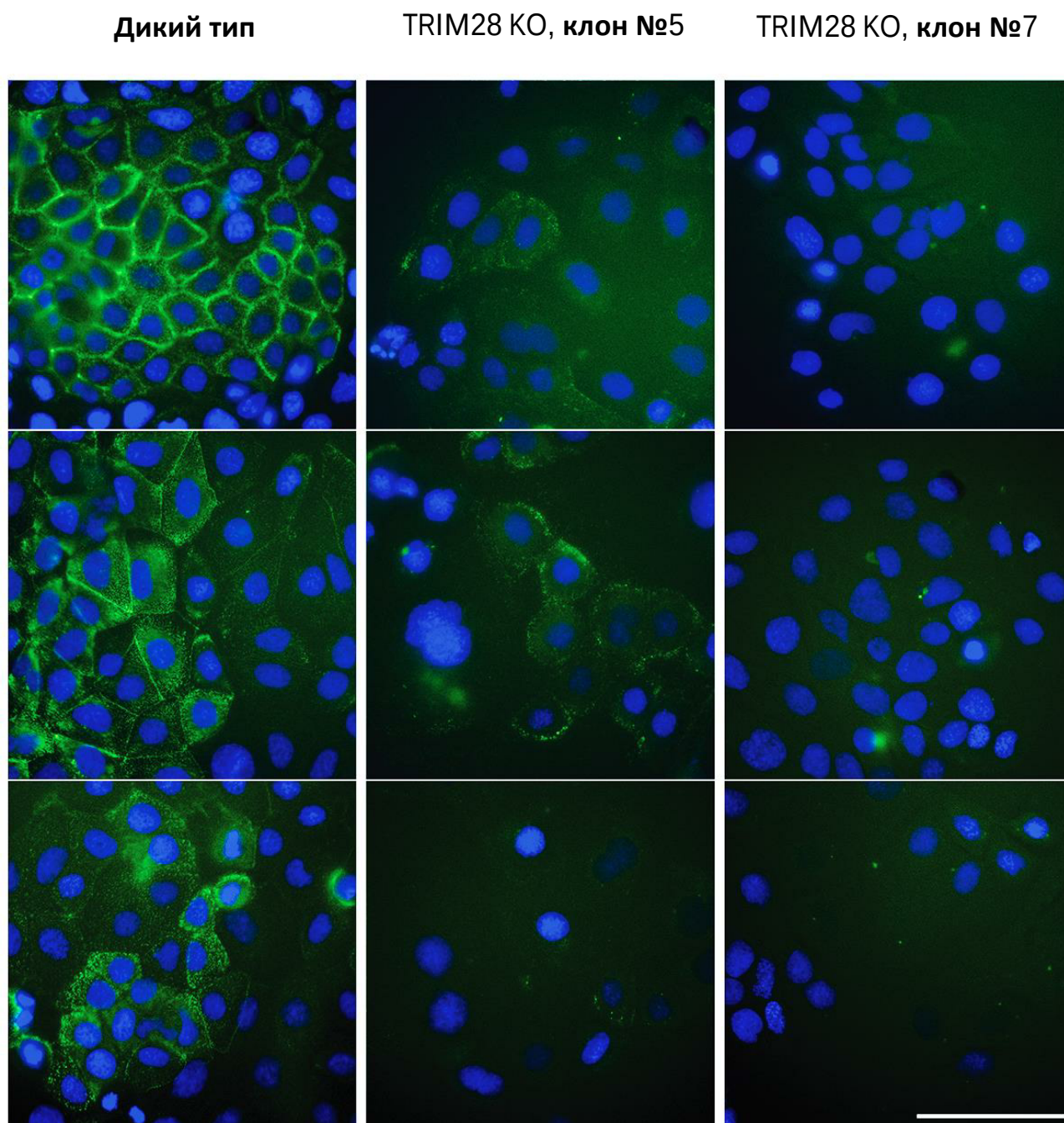


Рисунок 19. Мембранная экспрессия CD133 (зеленое свечение) в клетках Caco2 дикого типа и с нокаутом TRIM28. Флуоресцентная микроскопия. Окрашивание: DAPI и anti-CD133-VioBright FITC. Масштабная полоска – 100 мкм.

5. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Один из наиболее точных и удобных в использовании способов выявления и изоляции РСК основан на анализе дифференциально экспрессирующихся в этой популяции молекул. На сегодняшний день известно около двух десятков белков, используемых в качестве маркеров РСК, большая часть из которых является мембранными молекулами «кластера дифференцировки» (CD). При системном анализе публикаций мы показали, что в применении к солидным опухолям эпителиального происхождения CD133 является наиболее часто используемым и надежным маркером РСК (**Рисунки 5, 6**).

Чтобы выбрать подходящую модель для исследования клеточных популяций с различным уровнем экспрессии CD133, мы проанализировали экспрессию этого маркера в 21 опухолевой линии и лишь в четырех из них обнаружили наличие CD133⁺ клеток (**Таблица 1, Рисунки 7, 8 и Приложение 3**). Две из четырех линий оказались линиями колоректального рака, при этом в остальных трех линиях колоректального рака (SW480, SW837 и HCT116) популяция CD133⁺ клеток отсутствовала. Это не согласуется с нашими данными, полученными ранее на клиническом материале, где только 1 образец опухолевой ткани колоректального рака из 30 не имел CD133⁺ клеточной популяции [Gisina и др., 2021]. 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.

Среди 4 клеточных линий, имевших CD133⁺ популяцию, ее объем очень сильно отличался – от 5% у линии FTC-133 до 99% у линии Caco2 (**Рисунок 7 и Приложение 3**). Интересно, что ранее мы показали, что в хирургических образцах колоректального рака, полученных от разных пациентов, процент CD133⁺ клеток также сильно варьируется – от 1 до 65% [Gisina и др., 2021]. Важно отметить, что отсортированные CD133^{+/high} и CD133^{-/low} популяции имели тенденцию к восстановлению исходного фенотипа после нескольких недель культивирования.

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*. Для всех трех клеточных линий - Сасо2, НТ-29 и HUN7, мы показали взаимосвязь между повышенной экспрессией CD133 и их пролиферативной активностью. Так адаптированный к решению данной задачи алгоритм «Wizard Cell Cycle - Mitosis» программы IDEAS (**Рисунки 9, 10**) позволил сравнить МИ в популяциях CD133^{+high}, CD133^{-low} и CD133^{ref} всех трех клеточных линий. Клеточные популяции с более высоким уровнем CD133 имели значимо более высокий МИ, нежели клеточные популяции с меньшим уровнем CD133 (**Рисунки 11А, 12**).

Анализ кривой роста популяций с различным уровнем CD133 показал прямую корреляцию между экспрессией CD133 и скоростью роста в линии Сасо2, но не НТ-29 (**Рисунок 11В**). Возможно, такой результат был получен в связи с тем, что CD133⁺ клетки линии НТ-29 были представлены в основном клетками с невысоким уровнем экспрессии CD133 (**Рисунок 7**). В то же время, использование альтернативного пролиферативного теста, анализирующего рост отдельных колоний, позволило подтвердить прямую корреляцию между пролиферативной активностью и уровнем экспрессии CD133 в клетках обеих культур – Сасо2 и НТ-29 (**Рисунок 12**). Помимо этого, мы показали, что клетки с повышенной экспрессией CD133 линий Сасо2 и НТ-29 обладают не только повышенной пролиферативной, но и повышенной клоногенной активностью (**Рисунок 13**). В этих экспериментах не использовали линию HUN7 из-за ее неспособности расти в виде отдельных колоний. Наши результаты, полностью соответствуют литературным данным о повышенной пролиферативной и клоногенной активности CD133-сверхэкспрессирующих РСК, полученным с использованием других методических подходов [Kim и др., 2017].

Несмотря на явные различия в пролиферативной и клоногенной активностях между клетками с фенотипами CD133^{+high} и CD133^{-low}, транскриптомный и протеомный анализ выявили лишь небольшое количество различий в экспрессии

генов между этими популяциями во всех трех клеточных линиях (**Приложение 4**). Возможно, это связано с лабильным характером экспрессии CD133, поскольку популяция CD133⁻ и популяция CD133⁺ оказались способны восстанавливать противоположный фенотип. Также не исключено, что наличие CD133 не связано с существенным изменением других фенотипических характеристик. Мы не обнаружили связи между экспрессией конкретных мРНК и белков, что согласуется с литературными данными о расхождении между результатами транскриптомного и протеомного анализа [Ghazalpour и др., 2011; Poverennaya и др., 2017; Yeung, 2011]. Единственным геном, который дифференциально экспрессировался как на уровне транскрипта, так и на уровне белка, оказался трансгелин (TAGLN) с его повышенной экспрессией в CD133^{-low} клетках линии Caco2 (кратность изменения транскрипта – 0.44, белка – 0.48).

Интересно, что в популяции CD133^{+high} двух линий – HT-29 и HUH7, мы показали повышенную, соответственно в 2.9 и 1.8 раз, экспрессию маркера нормальных СК и РСК – ALDH1A1. Ко-экспрессия CD133 и ALDH1A1 была показана в популяциях РСК различных опухолей, включая колоректальный рак и гепатоклеточную карциному, что было подтверждено с помощью иммуногистохимического анализа или вестерн блота [Huang и др., 2010; Ma и др., 2008].

Для того чтобы понять, к каким общим группам, исходя из их функций и принадлежности к определенному компартменту, относятся найденные дифференциально экспрессируемые транскрипты и белки, мы провели *in silico* «GO анализ». Два общих термина группы «биологические процессы» («положительная регуляция биологических процессов» и «биологическая регуляция») оказались слишком базовыми для того, чтобы из них сделать вывод об ассоциированных с CD133 функциональных свойствах дифференциально экспрессирующихся генов. С другой стороны, 5 общих терминов группы «клеточные компоненты» включают общие свойства, которые можно объединить понятиями «внеклеточное пространство» и «экзосомы». Полученный результат 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], а также обнаруживаются при некоторых патологических состояниях [Bobinger и др., 2021].

Для анализа ключевых молекулярных регуляторов (KRs), которые регулируют группы дифференциально экспрессирующихся транскриптов и белков, мы провели *in silico* анализ с помощью интегрированных в GeneXplain баз данных TRANSFAC и TRANSPATH. Для многих KRs, предсказанных в результате анализа, уже имеются экспериментальные данные об их участии в регуляции экспрессии CD133. Наиболее известным из найденных нами ключевых регуляторов (**Таблица 2**), является HIF1A (индуцируемый гипоксией фактор 1 альфа). Он позитивно регулирует экспрессию CD133 при гипоксии, тем самым увеличивая скорость роста раковых клеток, их опухоль-инициирующую и метастатическую активность [Hashimoto и др., 2011a; Schwab и др., 2012; Soeda и др., 2009]. Интересно отметить, что под действием гипоксии меняется не только экспрессия, но и пост-трансляционная модификация CD133, в частности его гликозилирование [Lehnus и др., 2013]. Кроме того, в кооперации с еще одним предсказанным KR – RELA (он же p65 субъединица NF-kB), HIF1A способен к индукции экспрессии CD133 [Won и др., 2015]. Вступая во взаимодействие с неканоническим сайтом связывания в промотерной области CD133, еще один хорошо известный предсказанный нами KR – P53 способен снижать экспрессию CD133 [Park и др., 2015]. NANOG также способен к позитивной регуляции некоторых классических маркеров РСК, включая CD133 [Jeter и др., 2012]. Важно отметить, что в числе прочих транскрипционных факторов NANOG ответственен за поддержание плюрипотентного состояния эмбриональных СК, а также экспрессируется некоторыми СК во взрослом организме [Nigro, Roelandt, 2011]. Важно отметить, что вопрос о взаимосвязи РСК и нормальных СК остается открытым. Неизвестно, происходят ли первые из последних, или в ходе опухолевой микроэволюции лишь приобретают некоторые свойства, которые позволяют проводить между ними аналогии [Niekerk и др., 2017]. Однако важным фактом остается наличие функциональной и фенотипической пластичности РСК. Также существуют литературные данные о ко-экспрессии

CD133 еще с двумя, предсказанными KRс – EGR1 и HMGA1, однако их роль в регуляции CD133 неизвестна [Ernst и др., 2011; Pusa и др., 2014]. В итоге, мы нашли 16 потенциальных молекулярных регулятора CD133, для части из которых уже установлена их вовлеченность в регуляцию CD133, что подтверждает корректность проведенного *in silico* анализа.

Для верификации вовлеченности KR с наибольшим рангом – TRIM28 в регуляцию CD133 мы провели лентивирусный нокдаун TRIM28 и нокаут с помощью геномного редактирования CRISPR/CAS9. Подавление TRIM28 в клетках линии Caco2 не привело к изменению экспрессии CD133 (**Рисунок 16**), тогда как его полный нокаут вызвал значимое снижение присутствия CD133 на мембране клеток, что было подтверждено с помощью широкой панели клонов Caco2 (**Рисунки 17-19 и Приложение 6, 7**). С учетом комплексной природы регуляции экспрессии генов транскрипционными факторами [Koşar, Erbaş, 2022; Lee, Young, 2013] не является удивительным факт различий в действии частичного нокдауна и полного нокаута на исследуемый белок. Так, например, даже сниженный уровень экспрессии транскрипционного фактора *Nanog* во внутренней массе *Nanog*^{+/-} эмбриона мыши способен к подавлению экспрессии *Cdx2*, тогда как иммуногистохимическое окрашивание эмбриона мыши с генотипом *Nanog*^{-/-} позитивно по *Cdx2* [Chen и др., 2009]. Интересно, что к различному фенотипу приводят не только нокауты и нокдауны транскрипционных факторов, но и других белков, включая белки ферменты и подобные расхождения демонстрируют не только в условиях *in vitro*. Так мыши, обработанные anti-*Ppara* siRNA, демонстрируют похожий, но все же отличающийся фенотип, нежели мыши *Ppara*^{-/-} [Souza de и др., 2006].

Важно отметить, что TRIM28, по литературным данным обладает крайне широким спектром молекулярных функций, среди которых участие в эпителиально-мезенхимальном переходе [Chen, Muñoz-Antonia, 2014], транскрипции [Bunch и др., 2015] и в ответе на повреждение ДНК [Goodarzi, Kurka, 2011], поддержание плюрипотентного состояния СК [Hu и др., 2009], инактивация p53 [Wang и др., 2005] и ряд других. При этом данные об участии TRIM28 в

регуляции CD133 в литературе отсутствуют, в отличие от некоторых других, найденных нами KRс. Существуют научные работы, демонстрирующие роль TRIM28 в биологии нормальной и раковой СК. Так его домены RING и PHD участвуют в поддержании плюрипотентности iPS клеток [Mazurek и др., 2021]. TRIM28 является специфическим маркером РСК глиобластомы и участвует в регуляции инвазивных свойств этих клеток [Jovčevska и др., 2014; Porčnik и др., 2021]. Нокдаун TRIM28 в клеточной линии рака молочной железы MDA-MB-231 уменьшает количество РСК, а также их туморогенность при введении мышам с иммунодефицитом [Czerwińska и др., 2016]. Сверхэкспрессия TRIM28 в другой клеточной линии рака молочной железы – MCF7 увеличивает число и размер формируемых клетками мамосфер, также как и долю CD44⁺ CD24⁻ клеток (фенотип РСК при раке молочной железы), в то время как снижение уровня экспрессии TRIM28 в линиях MCF7 и TD47 ингибирует формирование мамосфер [Li и др., 2017]. Клеточные линии меланомы с высоким уровнем экспрессии TRIM28 имеют большую склонность к образованию меланосфер, а у пациентов с меланомой высокий уровень экспрессии TRIM28 коррелирует со снижением уровня инфильтрирующих опухоль лимфоцитов и является параметром, коррелирующим с негативным прогнозом для пациентов [Czerwinska и др., 2020]. Экспрессия TRIM28 коррелирует с негативным прогнозом и у пациентов с глиомой [Qi и др., 2016], гепатоклеточной карциномой [Wang и др., 2016], раком яичника [Cui и др., 2015], ранними стадиями немелкоклеточного рака легких [Liu и др., 2013]. Таким образом, следует отметить, что, как и в случае с CD133, экспрессия TRIM28 ассоциируется со злокачественными свойствами клеток и негативным прогнозом для пациентов.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной теоретической и экспериментальной работы были охарактеризованы в сравнительном плане функциональные и фенотипические особенности опухолевых клеток с различным уровнем экспрессии CD133, а также выявлен новый молекулярный регулятор экспрессии CD133 – транскрипционный фактор TRIM28. Таким образом, полученный результат полностью соответствует заявленной цели исследования.

Для достижения цели исследования был решен целый ряд конкретных задач: была проведена оценка частоты упоминания различных маркеров РСК в научной литературе; проанализирована 21 клеточная линия опухолей человека на наличие CD133⁺ популяции и выбраны клеточные модели для дальнейшего исследования; проведено сравнительное изучение способности к пролиферации и формированию колоний клетками с различным уровнем экспрессии CD133; с использованием ДНК-микрочипов и масс-спектрометрии высокого разрешения получены дифференциальные профили экспрессии транскриптов и белков в клетках с различным уровнем экспрессии CD133; с помощью *in silico* анализа были предсказаны и ранжированы потенциальные молекулярные регуляторы экспрессии CD133; проведены эксперименты по верификации наиболее перспективного молекулярного регулятора – TRIM28 методом shRNA нокдауна и CRISPR/CAS9 геномного нокаута.

На основании данных, полученных в результате выполненных исследовательских работ, можно сформулировать следующие **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 HT-29, 71 в Caco2, 66 в HUH7, а количество дифференциальных белков: 39 в Caco2, 35 в HT-29, 75 в HUH7.

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.

Выполненная научно-исследовательская работа может послужить основой для проведения дальнейших исследований, как фундаментального, так и прикладного характера. Определенный интерес представляют перспективы более полного выяснения прогностической значимости TRIM28, а также исследование его ассоциации с CD133 на клиническом материале различных опухолей человека. Важной выглядит оценка возможности использования TRIM28 в качестве мишени для потенциальных химических ингибиторов и таргетной терапии.

Для фундаментальных исследований, направленных на дальнейшее выяснение молекулярных механизмов регуляции экспрессии CD133, весьма востребованными могут оказаться данные молекулярного профилирования и *in silico* анализа. Способность влиять на экспрессию CD133 таких предсказанных потенциальных молекулярных регуляторов, как - MYB, CREB1, REST, CEBPA, GABPB1, E2F1, E2F3, E2F4, E2F7, EGR1, HMGA1 не была исследована в рамках данной работы. Отсутствуют также и литературные данные о воздействии этих молекул на CD133. В этой связи не исключено, что предсказанные регуляторные молекулы могут быть вовлечены в TRIM23-зависимый или альтернативные пути

регуляции экспрессии CD133. Таким образом, дополнительные исследования могут расширить понимание механизмов регуляции CD133 и роли CD133 в формировании фенотипических свойств РСК.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Al-Hajj M. и др. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Т. 100. С. 3983–3988.
2. Askanazy M. D. T. nach ihrem B. ihrem V. ihrer G. und im V. zum experimentellen Teratoid. Verhandl. Deutsch. Pathol., 11:39-82, 1907. Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid. // Verhandl. Deutsch. Pathol. 1907. Т. 11. С. 39–82.
3. Attia S. и др. Expression of CD133 as a cancer stem cell marker in invasive gastric carcinoma // Pathologica. 2019. Т. 111. № 1. С. 18–23.
4. Bao S. и др. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor // Cancer Res. 2006. Т. 66. № 16. С. 7843–7848.
5. Bapat S. A. и др. Stem and Progenitor-Like Cells Contribute to the Aggressive Behavior of Human Epithelial Ovarian Cancer // Cancer Res. 2005. Т. 65. № 8. С. 3025–3029.
6. Barker N. и др. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer // Nature. 2009. Т. 457. № 7229. С. 608–611.
7. Bauer N. и др. 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. Т. 3. № 7. С. 398–409.
8. Bayin N. S. и др. Selective lentiviral gene delivery to CD133-expressing human glioblastoma stem cells // PLoS One. 2014. Т. 9. № 12.
9. Bertolini G. и др. Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment // Proc Natl Acad Sci U S A. 2009. Т. 106. № 38. С. 16281–16286.
10. Bobinger T. и др. Variation of membrane particle-bound CD133 in cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid and intracerebral hemorrhage // J Neurosurg. 2021. Т. 134. № 2. С. 600–607.
11. Bonnet D., Dick J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell // Nat Med. 1997. Т. 3. № 7. С. 730–737.
12. Brown D. v. и др. Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intratumor heterogeneity // PLoS One. 2017. Т. 12. № 2.
13. Bunch H. и др. Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling // Nat Commun. 2015. Т. 6. С. 1–12.

14. Cao L. и др. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines // *BMC Gastroenterol.* 2011. Т. 11.
15. Chang J. C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance // *Medicine (United States).* 2016. Т. 95. № 1. С. S20–S25.
16. Chen L. и др. Cross-regulation of the nanog and Cdx2 promoters // *Cell Res.* 2009. Т. 19. № 9. С. 1052–1061.
17. Chen L., Muñoz-Antonia T., Cress W. D. Trim28 contributes to EMT via regulation of E-cadherin and N-cadherin in lung cancer cell lines. // *PLoS One.* 2014. Т. 9. № 7. С. e101040.
18. Chen S. и др. CD133 Expression and the Prognosis of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis // *PLoS One.* 2013. Т. 8. № 2. С. 1–9.
19. Chikamatsu K. и др. Alteration of cancer stem cell-like phenotype by histone deacetylase inhibitors in squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer Sci.* 2013. Т. 104. № 11. С. 1468–1475.
20. Chu P. Y. и др. Epithelial-mesenchymal transition transcription factor ZEB1/ZEB2 co-expression predicts poor prognosis and maintains tumor-initiating properties in head and neck cancer // *Oral Oncol.* 2013. Т. 49. № 1. С. 34–41.
21. Clarkson B. и др. Studies of cellular proliferation in human leukemia. I. Estimation of growth rates of leukemic and normal hematopoietic cells in two adults with acute leukemia given single injections of tritiated thymidine. // *J Clin Invest.* 1967. Т. 46. № 4. С. 506–529.
22. Clarkson B. D. Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukemia. // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1969. Т. 30. С. 81–120.
23. Clermont Y., Leblond C. P. Renewal of spermatogonia in the rat. // *Am. J. Anat.* 1953. Т. 93. С. 475–501.
24. Collins A. T. и др. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells // *Cancer Res.* 2005. Т. 65. № 23. С. 10946–10951.
25. Corbeil D и др. AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? // *Blood.* 1998. Т. 91. С. 2625–2626.
26. Corbeil D. и др. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation // *FEBS Lett.* 2010. Т. 584. № 9. С. 1659–1664.

27. Cui Y. и др. High levels of KAP1 expression are associated with aggressive clinical features in ovarian cancer // *Int J Mol Sci*. 2015. Т. 16. № 1. С. 363–377.
28. Curley M. D. и др. CD133 expression defines a tumor initiating cell population in primary human ovarian cancer // *Stem Cells*. 2009. Т. 27. № 12. С. 2875–2883.
29. Czerwińska P. и др. TRIM28 multi-domain protein regulates cancer stem cell population in breast tumor development // 2016. Т. 8. № 1. С. 863–882.
30. Czerwinska P. и др. Melanoma stem cell-like phenotype and significant suppression of immune response within a tumor are regulated by trim28 protein // *Cancers (Basel)*. 2020. Т. 12. № 10. С. 1–20.
31. DePinho R. The age of cancer // *Nature*. 2000. Т. 408. С. 248–254.
32. Dittrich W., Göhde W. Flow-through Chamber for Photometers to Measure and Count Particles in a Dispersion Medium. // *Bibliographic data*. 1971. Т. DE1815352.
33. Dubreuil V. и др. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1 // *Journal of Cell Biology*. 2007. Т. 176. № 4. С. 483–495.
34. Eramo A. и др. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population // *Cell Death Differ*. 2008. Т. 15. № 3. С. 504–514.
35. Ernst A. и др. A gene signature distinguishing CD133hi from CD133^{low} colorectal cancer cells: Essential role for EGR1 and downstream factors // *Pathology*. 2011. Т. 43. № 3. С. 220–227.
36. Fang D. и др. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas // *Cancer Res*. 2005. Т. 65. № 20. С. 9328–9337.
37. Fawcett D. W. Bilateral Ovarian Teratomas in Mouse. // *Cancer Res*. 1950. Т. 12. С. 705–707.
38. Fekete E., Ferrigno M. A. Studies on Transplantable Teratoma of Mouse. // *Cancer Res*. 1952. Т. 12. С. 438–440.
39. Feng R., Wen J. Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development // *Biol Chem*. 2015. Т. 396. № 8. С. 883–891.
40. Furth J., Kahn M. The transmission of leukemia of mice with a single cell. // *Am. J. Cancer*. 1937. Т. 31. С. 276–282.
41. Gaetangi I. de, Blothner E. // *Ztsch. f. Krebsforsch*. 1936. Т. 44. № 108.
42. Ghazalpour A. и др. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. // *PLoS Genet*. 2011. Т. 7. № 6. С. e1001393.

43. Gisina A. и др. CEACAM5 overexpression is a reliable characteristic of CD133-positive colorectal cancer stem cells // *Cancer Biomarkers*. 2021. Т. 32. № 1. С. 85–98.
44. Gokulan R. C., Devaraj H. Stem cell markers CXCR-4 and CD133 predict aggressive phenotype and their double positivity indicates poor prognosis of oral squamous cell carcinoma // *Cancers (Basel)*. 2021. Т. 13. № 23.
45. Gong A., Huang S. FoxM1 and Wnt/ β -catenin signaling in glioma stem cells // *Cancer Res*. 2012. Т. 72. № 22. С. 5658–5662.
46. Goodarzi A. A., Kurka T., Jeggo P. A. KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response // *Nat Struct Mol Biol*. 2011. Т. 18. № 7. С. 831–839.
47. Griguer C. E. и др. CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma // *PLoS One*. 2008. Т. 3. № 11. С. e3655.
48. Han M. и др. Clinicopathological and Prognostic Significance of CD133 in Glioma Patients: A Meta-Analysis // *Mol Neurobiol*. 2016. Т. 53. № 1. С. 720–727.
49. Hansford L. M. и др. Neuroblastoma cells isolated from bone marrow metastases contain a naturally enriched tumor-initiating cell // *Cancer Res*. 2007. Т. 67. № 23. С. 11234–11243.
50. Harrison H. и др. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor // *Cancer Res*. 2010. Т. 70. № 2. С. 709–718.
51. Hashimoto O. и др. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells // *Pathobiology*. 2011a. Т. 78. № 4. С. 181–192.
52. Hashimoto O. и др. Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells // *Pathobiology*. 2011b. Т. 78. № 4. С. 181–192.
53. Hermann P. C. и др. Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer // *Cell Stem Cell*. 2007. Т. 1. № 3. С. 313–323.
54. Hsu H. S. и др. Cucurbitacin i inhibits tumorigenic ability and enhances radiochemosensitivity in nonsmall cell lung cancer-derived CD133-positive cells // *Cancer*. 2011. Т. 117. № 13. С. 2970–2985.
55. Huang E. H. и др. Aldehyde Dehydrogenase 1 Is a Marker for Normal and Malignant Human Colonic Stem Cells (SC) and Tracks SC Overpopulation during Colon Tumorigenesis // 2010. Т. 69. № 8. С. 3382–3389.

56. Huang R. и др. CD133 expression correlates with clinicopathologic features and poor prognosis of colorectal cancer patients: An updated meta-analysis of 37 studies // *Medicine (United States)*. 2018. Т. 97. № 23. С. e10446.
57. Hu G. и др. A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal // *Genes Dev*. 2009. С. 837–848.
58. Iida H. и др. Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2 // *Int J Oncol*. 2012. Т. 40. № 1. С. 71–79.
59. Jacson E. B. „, Bruece A. M. Studies on Transplantable Embryoma of the Mouse. // *Cancer Res*. 1941. Т. 1. С. 494–498.
60. Jeter C. R. и др. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation Collene // *Oncogene*. 2012. Т. 30. № 36. С. 3833–3845.
61. Jia Q. и др. Positive correlation of Oct4 and ABCG2 to chemotherapeutic resistance in CD90+CD133+ liver cancer stem cells // *Cell Reprogram*. 2013a. Т. 15. № 2. С. 143–150.
62. Jia Q. и др. Positive correlation of Oct4 and ABCG2 to chemotherapeutic resistance in CD90+CD133+ liver cancer stem cells // *Cell Reprogram*. 2013b. Т. 15. № 2. С. 143–150.
63. Jin L. и др. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells // *Nat Med*. 2006. Т. 12. № 10. С. 1167–1174.
64. Jovčevska I. и др. TRIM28 and β -actin identified via nanobody-based reverse proteomics approach as possible human glioblastoma biomarkers // *PLoS One*. 2014. Т. 9. № 11. С. 1–22.
65. Karthika C. и др. Multidrug Resistance in Cancer Cells: Focus on a Possible Strategy Plan to Address Colon Carcinoma Cells // *Life*. 2022. Т. 12. № 6.
66. Kim Y. S. и др. Cancer stem cell molecular markers verified in vivo // *Biochem Mosc Suppl B Biomed Chem*. 2017. Т. 11. № 1. С. 43–54.
67. Kleinsmith L. J., Pierce G. B. Jr. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. // *Cancer Res*. 1964. Т. 24. С. 1544–1551.
68. Kohga K. и др. Expression of CD133 confers malignant potential by regulating metalloproteinases in human hepatocellular carcinoma // *J Hepatol*. 2010. Т. 52. № 6. С. 872–879.
69. Koşar Z., Erbaş A. Can the Concentration of a Transcription Factor Affect Gene Expression? // *Frontiers in Soft Matter*. 2022. Т. 2.

70. Kreso A., Dick J. E. Evolution of the cancer stem cell model // *Cell Stem Cell*. 2014. Т. 14. № 3. С. 275–291.
71. Landen C. N. и др. Targeting aldehyde dehydrogenase cancer stem cells in ovarian cancer // *Mol Cancer Ther*. 2010. Т. 9. № 12. С. 3186–3199.
72. Lau W. M. и др. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells // *Cancer Res*. 2014. Т. 74. № 9. С. 2630–2641.
73. Lee T. I., Young R. A. Transcriptional regulation and its misregulation in disease // *Cell*. 2013. Т. 152. № 6. С. 1237–1251.
74. Lehnus K. S. и др. CD133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells // *Int J Oncol*. 2013. Т. 42. № 3. С. 1011–1017.
75. Li C. и др. Identification of pancreatic cancer stem cells // *Cancer Res*. 2007. Т. 67. № 3. С. 1030–1037.
76. Li J. и др. TRIM28 interacts with EZH2 and SWI/SNF to activate genes that promote mammosphere formation // *Oncogene*. 2017. Т. 36. № 21. С. 2991–3001.
77. Liou G. Y. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells // *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019. Т. 106. С. 1–7.
78. Liu C. и др. The interaction between cancer stem cell marker CD133 and Src protein promotes Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylation and cell migration // *Journal of Biological Chemistry*. 2016. Т. 291. № 30. С. 15540–15550.
79. Liu L. и др. TRIM28, a new molecular marker predicting metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer // *Cancer Epidemiol*. 2013. Т. 37. № 1. С. 71–78.
80. Li X. и др. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC): a systematic review and meta-analysis // *Int J Clin Exp Pathol*. 2015a. Т. 8. № 10. С. 12084–12092.
81. Li Y. и др. CD133 overexpression correlates with clinicopathological features of gastric cancer patients and its impact on survival: A systematic review and meta-analysis // *Oncotarget*. 2015b. Т. 6. № 39. С. 42015–42027.
82. López-Gil J. C. и др. The CXCL12 crossroads in cancer stem cells and their niche // *Cancers (Basel)*. 2021. Т. 13. № 3. С. 1–32.
83. Lou Y. и др. MicroRNA-21 promotes the cell proliferation, invasion and migration abilities in ovarian epithelial carcinomas through inhibiting the expression of PTEN protein // *Int J Mol Med*. 2010. Т. 26. № 6. С. 819–827.
84. Mak A. B. и др. Regulation of CD133 by HDAC6 Promotes β -Catenin Signaling to Suppress Cancer Cell Differentiation // *Cell Rep*. 2012. Т. 2. № 4. С. 951–963.

85. Marzagalli M. и др. Cancer Stem Cells-Key Players in Tumor Relapse // 2021.
86. Marzesco A. M. и др. Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells // J Cell Sci. 2005. Т. 118. № 13. С. 2849–2858.
87. Ma S. и др. Aldehyde Dehydrogenase Discriminates the CD133 Liver Cancer Stem Cell Populations // Molecular Cancer Research. 2008. Т. 6. № 7. С. 1146–1153.
88. Ma S. и др. MiR-130b promotes CD133+ liver tumor-initiating cell growth and self-renewal via tumor protein 53-induced nuclear protein 1 // Cell Stem Cell. 2010. Т. 7. № 6. С. 694–707.
89. Mazurek S. и др. Disruption of RING and PHD domains of TRIM28 evokes differentiation in human iPSCs // Cells. 2021. Т. 10. № 8.
90. Medina D. J. и др. Cobblestone-area forming cells derived from patients with mantle cell lymphoma are enriched for CD133+ tumor-initiating cells // PLoS One. 2014. Т. 9. № 4.
91. Miraglia S. и др. A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning // Blood. 1997. Т. 90. № 12. С. 5013–5021.
92. Mortezaee K. CXCL12/CXCR4 axis in the microenvironment of solid tumors: A critical mediator of metastasis // Life Sci. 2020. Т. 249.
93. Niekerk G. van и др. Cancer stem cells: A product of clonal evolution? // Int J Cancer. 2017. Т. 140. № 5. С. 993–999.
94. Nigro A., Roelandt P., Verfaillie C. M. Expression and Function of Pluripotency Genes in Adult Stem Cells // Adult Stem Cells. , 2011. С. 95–112.
95. Nowell P. C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations Acquired genetic lability permits stepwise selection of variant sublines and underlies tumor progression // Science. 1976. Т.194. № 7123. С. 106–110.
96. O'Brien C. A. и др. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice // Nature. 2007. Т. 445. № 4260. С. 23–28.
97. Olsson E. и др. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers // BMC Cancer. 2011. Т. 11. №418.
98. Palapattu G. S. и др. Selective expression of CD44, a putative prostate cancer stem cell marker, in neuroendocrine tumor cells of human prostate cancer // Prostate. 2009. Т. 69. № 7. С. 787–798.

99. Pan G., Thomson J. A. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency // *Cell Res.* 2007. Т. 17. № 1. С. 42–49.
100. Pan J. G. и др. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4 // *Cell Res.* 2002. Т. 12. № 6. С. 321–329.
101. Park E. K. и др. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53 // *Cell Death Dis.* 2015. Т. 6. С. 1–12.
102. Park I. K., Morrison S. J., Clarke M. F. Bmi1, stem cells, and senescence regulation // *Journal of Clinical Investigation.* 2004. Т. 113. № 2. С. 175–179.
103. Pham P. v. и др. Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: Promising differentiation therapy // *J Transl Med.* 2011. Т. 9. № 1.
104. Pierce G. Teratocarcinomas. // *Can. Cancer Conf.* , 1961. С. 119–137.
105. Pierce G. B., Dixon F. J., Andverney E. L. Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies // *Lab Invest.* 1960. Т. 9. С. 583–602.
106. Pierce G. B., Speers W. C. Tumors as Caricatures of the Process of Tissue Renewal: Prospects for Therapy by Directing Differentiation¹ // *Cancer Res.* 1988. Т. 48. С. 1996–2004.
107. Pierce G. B., Wallace C. Differentiation of malignant to benign cells. // *Cancer Res.* 1971. Т. 31. С. 127–134.
108. Pode-Shakked N. и др. The isolation and characterization of renal cancer initiating cells from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets // *EMBO Mol Med.* 2013. Т. 5. № 1. С. 18–37.
109. Porčnik A. и др. Trim28 selective nanobody reduces glioblastoma stem cell invasion // *Molecules.* 2021. Т. 26. № 17.
110. Post Y., Clevers H. Defining Adult Stem Cell Function at Its Simplest: The Ability to Replace Lost Cells through Mitosis // *Cell Stem Cell.* 2019. Т. 25. № 2. С. 174–183.
111. Poverennaya E. v. и др. Why Are the Correlations between mRNA and Protein Levels so Low among the 275 Predicted Protein-Coding Genes on Human Chromosome 18? // *J Proteome Res.* 2017. Т. 16. № 12. С. 4311–4318.
112. Puca F. и др. HMGA1 silencing restores normal stem cell characteristics in colon cancer stem cells by increasing p53 levels. // *Oncotarget.* 2014. Т. 5. № 10. С. 3234–45.
113. Qi Z. X. и др. TRIM28 as an independent prognostic marker plays critical roles in glioma progression // *J Neurooncol.* 2016. Т. 126. № 1. С. 19–26.

114. Rao X. и др. An improvement of the $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis // 2013. Т. 3. № 3. С. 71-85.
115. Ricci-Vitiani L. и др. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells // Nature. 2007. Т. 445. № 7123. С. 111–115.
116. Richardson G. D. и др. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells // J Cell Sci. 2004. Т. 117. № 16. С. 3539–3545.
117. Richter R.M. , McDowelle C. // J. Exper. Med. 1933. Т. 57. № 1.
118. Rountree C. B. и др. A CD133-Expressing Murine Liver Oval Cell Population with Bilineage Potential // Stem Cells. 2007. Т. 25. № 10. С. 2419–2429.
119. Rous P. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells // Journal of Experimental Medicine. 1911. Т. 13. № 4. С. 973–411.
120. Rubin J. B. и др. A small-molecule antagonist of CXCR4 inhibits intracranial growth of primary brain tumors // PNAS. 2003. Т. 23. № 100. С. 13513-13518.
121. Samanta S., Pursell B., Mercurio A. M. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression // Journal of Biological Chemistry. 2013. Т. 288. № 18. С. 12569–12573.
122. Schwab L. P. и др. Hypoxia-inducible factor 1 α promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer // Breast Cancer Research. 2012. Т. 14. № 1. С. R6.
123. Senbanjo L. T., Chellaiah M. A. CD44: A multifunctional cell surface adhesion receptor is a regulator of progression and metastasis of cancer cells // Front Cell Dev Biol. 2017. Т. 5. № 18.
124. Shi C. J. и др. Cd133+ gallbladder carcinoma cells exhibit self-renewal ability and tumorigenicity // World J Gastroenterol. 2011. Т. 17. № 24. С. 2965–2971.
125. Shi Y. и др. The microRNA miR-34a inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) growth and the CD44hi stem-like NSCLC cells // PLoS One. 2014. Т. 9. № 3.
126. Shi Y., Ai W. Function of KLF4 in Stem Cell Biology // Pluripotent Stem Cells. InTech. 2013.
127. Singh S. K. и др. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors // Cancer Res. 2003. Т. 63. С. 5821–5828.
128. Soeda A. и др. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1 α // Oncogene. 2009. Т. 28. № 45. С. 3949–3959.
129. Souza A. T. de и др. Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice // Nucleic Acids Res. 2006. Т. 34. № 16. С. 4486–4494.

130. Sugano T. и др. Inhibition of ABCB1 overcomes cancer stem cell-like properties and acquired resistance to MET inhibitors in non-small cell lung cancer // *Mol Cancer Ther.* 2015. Т. 14. № 11. С. 2433–2440.
131. Sung P. H. и др. CD44-positive cells are responsible for gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells // *Int J Cancer.* 2009. Т. 125. № 10. С. 2323–2331.
132. Suvà M. L. и др. Identification of cancer stem cells in Ewing's sarcoma // *Cancer Res.* 2009. Т. 69. № 5. С. 1776–1781.
133. Tamaki S. и др. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain // *J Neurosci Res.* 2002. Т. 69. № 6. С. 976–986.
134. Thamm K. и др. Prominin-1 (CD133) modulates the architecture and dynamics of microvilli // *Traffic.* 2019. Т. 20. № 1. С. 39–60.
135. Uchida N. и др. Direct isolation of human central nervous system stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26): 14720-5. 2000. Т. 97. № 26. С. 14720–14725.
136. Visvader J. E. Cells of origin in cancer // *Nature.* 2011. Т. 469. № 7330. С. 314–322.
137. Wang C. и др. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation // *EMBO Journal.* 2005. Т. 24. № 18. С. 3279–3290.
138. Wang J.-L. и др. CD44v6 overexpression related to metastasis and poor prognosis of colorectal cancer: A meta-analysis // *Oncotarget.* 2017. Т. 8. № 8. С. 12866–12876.
139. Wang Y. и др. KAP1 is overexpressed in hepatocellular carcinoma and its clinical significance // *Int J Clin Oncol.* 2016. Т. 21. № 5. С. 927–933.
140. Ward H. H. и др. Adult human CD133/1+ kidney cells isolated from papilla integrate into developing kidney tubules // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2011. Т. 1812. № 10. С. 1344–1357.
141. Weigmann A. и др. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. Т. 94. С. 12425–12430.
142. Wei Y. и др. Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013. Т. 110. № 17. С. 6829–6834.
143. Wilson A. и др. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation // *Genes Dev.* 2004. Т. 18. № 22. С. 2747–2763.
144. Wolmarans E. и др. Side population: ITs use in the study of cellular heterogeneity and as a potential enrichment tool for rare cell populations // *Stem Cells Int.* 2018. Т. 2018.

145. Won C. и др. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma // *Hepatology*. 2015. Т. 62. № 4. С. 1160–1173.
146. Wright J. Neurocytoma and neuroblastoma, a kind of tumor not generally recognized. // *J Exp Med*. 1910. С. 556–561.
147. Xu H. и др. CD44 as a tumor biomarker and therapeutic target // *Exp Hematol Oncol*. 2020. Т. 9. № 1.
148. Yang L. и др. Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy // *Signal Transduct Target Ther*. 2020. Т. 5. № 1.
149. Yan L. X. и др. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth // *Breast Cancer Research*. 2011. Т. 13. № 1.
150. Yeung E. S. Genome-wide correlation between mRNA and protein in a single cell // *Angewandte Chemie - International Edition*. 2011. Т. 50. № 3. С. 583–585.
151. Yin A. H. и др. AC133, a Novel Marker for Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells myelomonocytic, and megakaryocytic repopulation in vivo while the CD34 dim population contains lineage-committed // *Blood*. 1997. Т. 90. С. 5002–5012.
152. You H., Ding W., Rountree C. B. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor- β // *Hepatology*. 2010. Т. 51. № 5. С. 1635–1644.
153. Zacchigna S. и др. Loss of the Cholesterol-Binding Protein Prominin-1/CD133 Causes Disk Dysmorphogenesis and Photoreceptor Degeneration // *Journal of Neuroscience*. 2009. Т. 29. № 7. С. 2297–2308.
154. Zhang J. и др. MicroRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through negative regulation of the transcription factor c-Myb // *Int J Oncol*. 2012. Т. 40. № 3. С. 747–756.
155. Zhang X. и др. Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells // *Drug Des Devel Ther*. 2015. Т. 9. С. 2399–2407.
156. Zhang Z. и др. Human CD133-positive hematopoietic progenitor cells enhance the malignancy of breast cancer cells // *BMC Cancer*. 2020. Т. 20. № 1.
157. Zhou Q. и др. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 in ovarian cancer: a meta-analysis // *Int J Clin Exp Med*. 2015. Т. 8. № 3. С. 3080–3088.
158. Zhu S. и др. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1) // *Journal of Biological Chemistry*. 2007. Т. 282. № 19. С. 14328–14336.

8. 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., к.б.н. 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 исследования и супервизию работы.

9. ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства Науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2020-792 (Уникальный идентификатор RF-190220X0031), а также в рамках проекта по созданию и развитию научных центров мирового уровня «Цифровой дизайн и персонализированное здравоохранение» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2022-305).

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Нуклеотидные последовательности: ***A*** – праймеров для ПЦР в реальном времени, ***B*** – кодирующие shRNA для лентивирусной трансдукции (целевые последовательности выделены жирным шрифтом). ***C*** – кодирующие gRNA для геномного редактирования методом CRISPR/CAS9 (целевые последовательности выделены жирным шрифтом).

A

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР (5' → 3')	
OCT4a	Fw	GTGGAGAGCAACTCCGATG
	Rev	TGCAGAGCTTTGATGTCCTG
SOX2	Fw	GCGAACCATCTCTGTGGTCT
	Rev	GGAAAGTTGGGATCGAACAA
KLF4	Fw	GCTGCTCCCATCTTTCTCCA
	Rev	AGATCGTTGAACTCCTCGGT
MYC	Fw	CAAACCTCCTCACAGCCCACT
	Rev	TTCGCCTCTTGACATTCTCCTC
NANOG	Fw	CTGCTGAGATGCCTCACACG
	Rev	TCTGGTCTTCTGTTTCTTGACC
BMI1	Fw	GTTACAAGACCAGACCACT
	Rev	CTCCTCCTTAGATTTCTCTTTG
ABCG2	Fw	GCACTCTGACGGTGAGAGAAAA
	Rev	CCAGACACACCACGGATAAACT
ABCB1	Fw	AATGCGACAGGAGATAGGCT
	Rev	CCAAGACCTCTTCAGCTACT
ALDH1A1	Fw	CAGGTTGGGCTGACAAGATCC
	Rev	CGTGGAGAGCAGTGAGAGGA
CD133	Fw	TTGGAGAGAGTAACTAGGATTC
	Rev	ACAGAAAGACATCAACAGCAGT
ACTB	Fw	CCTCGCCTTTGCCGATCC
	Rev	CCTTCTGACCCATGCCCA

HPRT	Fw	ACCAGTCAACAGGGGACATAA
	Rev	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC
UBC	Fw	CTGGTAAGACCATCACCCCTC
	Rev	TGTCACTGGGCTCGACCTCA

B

Ген		Последовательности, кодирующие shRNA (5' → 3')
TRIM28	sense	GATCCGCATGAACCCCTTGTGCTGTTCAAGAGACAGCACAAGGGGTT CATGCTTTTTG
	antisense	AATTCAAAAAGCATGAACCCCTTGTGCTGTCTCTTGAACAGCACAAGG GGTTCATGCG
Luc	sense	GATCCCGTACGCGGAATACTTCGATTCAAGAGATCGAAGTATTCCGCG TACGTTTTTG
	antisense	AATTCAAAAACGTACGCGGAATACTTCGATCTCTTGAATCGAAGTATTC CGCGTACGG

C

Ген		Последовательности, кодирующие gRNA (5' → 3')
TRIM28	sense	caccGTTTGCACTCGGCCTGTAG
gRNA_1	antisense	aaacCTACAGGCCGAGTGCAAAC
TRIM28	sense	aaacCTGGCGGGCGAAAAGCGCTCC
gRNA_2	antisense	caccGGAGCGCTTTTCGCCGCCAG
TRIM28	sense	caccGACCGGTAAGTACGAAGTGAT
gRNA_3	antisense	aaacATCACTTCGTACTTACCGGTC
tagRFP	sense	caccGTCACCACATACGAAGACGG
	antisense	aaacCCGTCTTCGTATGTGGTGAC

Приложение 2. ***A** – RIPA-буфер для лизирования клеточного осадка и **B** – загрузочный буфер для нанесения лизата клеток на ПААГ.*

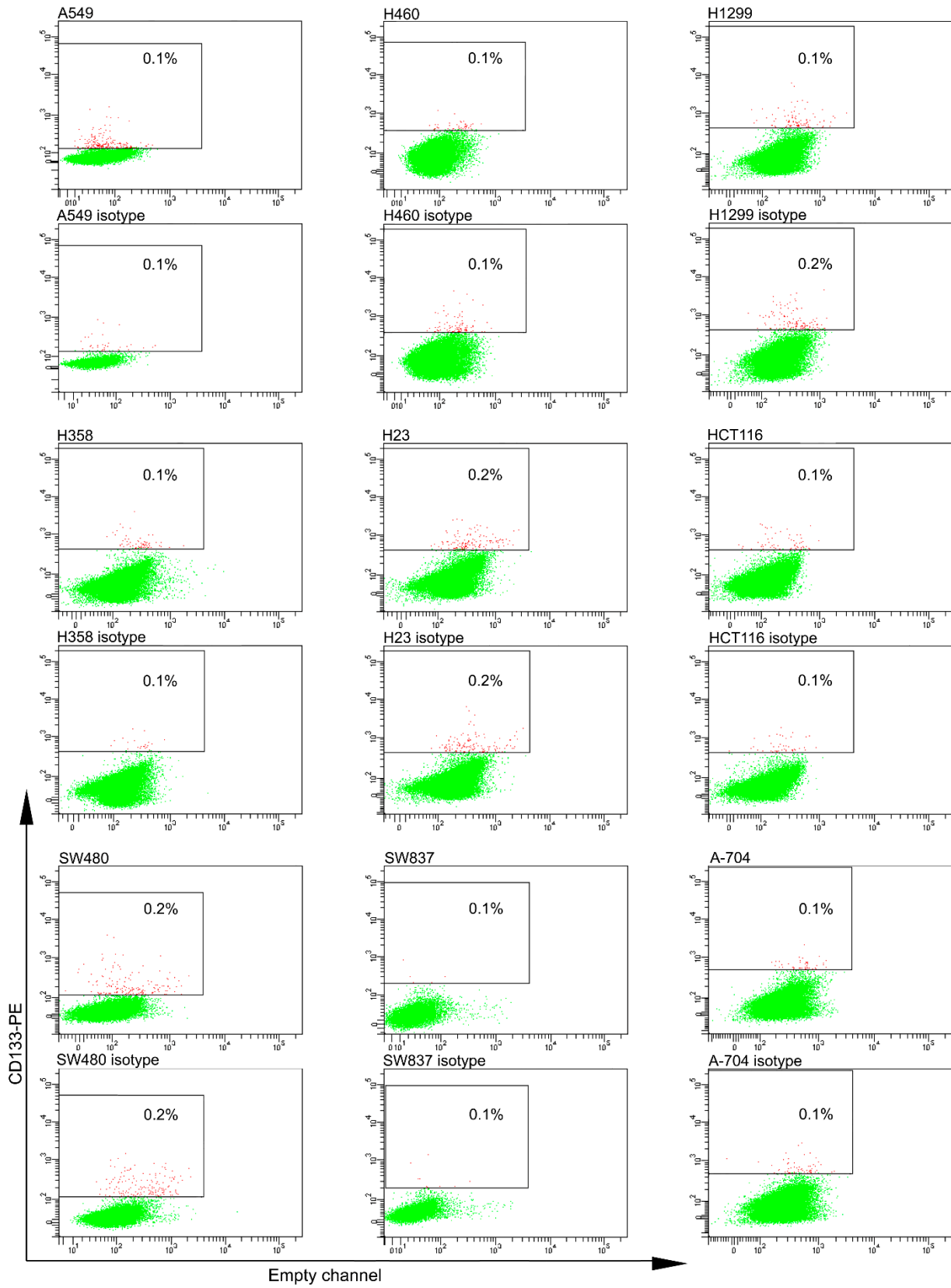
A

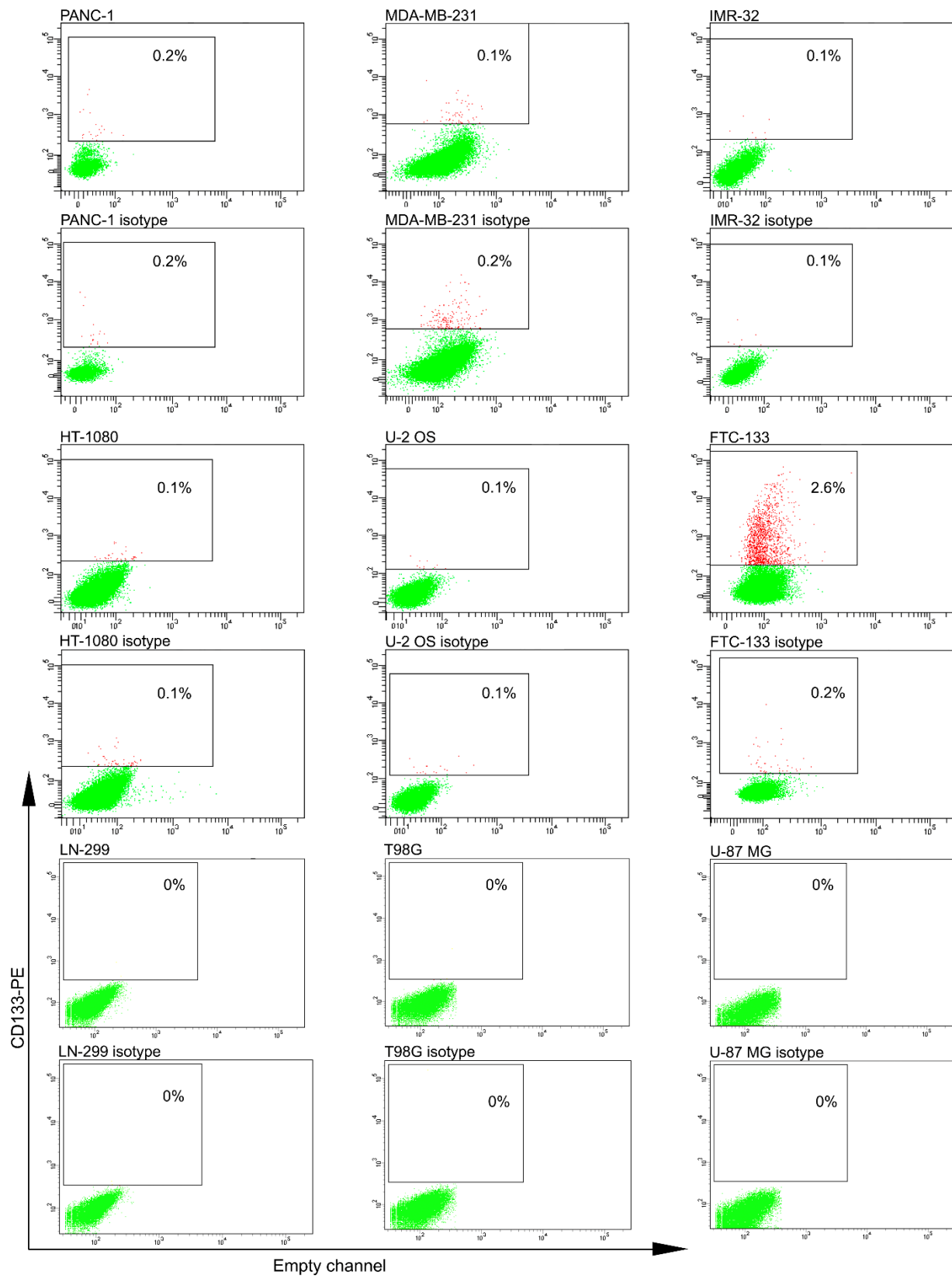
Реагент	Концентрация
NaCl	150 mM
Tris-HCl	50 mM
Nonidet P-40	1 %
Деоксихолат натрия	0.5 %
SDS	0.1 %

B

Реагент	Концентрация
Tris-HCl	200 mM
DTT	400 mM
SDS	280 mM
Бромфеноловый синий	6 mM
Глицерин	4.3 M

Приложение 3. Клеточные линии слабо положительные или отрицательные по экспрессии мембранного CD133.





Приложение 4. Дифференциально экспрессирующиеся в популяциях CD133^{+/high} и CD133^{-/low} клеточных линий Caco2, HT-29 и HUH7 транскрипты и белки. Кратность изменения – отношение количества транскрипта или белка в популяции CD133^{+/high} к популяции CD133^{-/low}.

* Транскрипты или белки, между которыми не удалось провести дифференциального различия из-за схожести их последовательностей.

ТРАНСКРИПТЫ

HT-29

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
HLA-DMB	4.21	CRYM	2.12
CD133	2.97	SLC4A4	2.06
GPC4	2.95	TOX2	0.49
RGS2	2.25	MAGEA2, MAGEA2B*	0.46
SNX10	2.17	SCEL	0.45

Caco2

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
AHSG	3.03	AXIN2	0.46
ALB	2.96	GABARAPL1	0.46
RBP4	2.70	TACSTD2	0.45
CYP4X1	2.62	COL4A6	0.45
CD133	2.57	RGCC	0.45
TFF3	2.32	CEP55	0.45
SCGN	2.31	S100A14	0.45
FRAS1	2.24	PODXL	0.44

TTR	2.17	PRSS23	0.44
BFSP1	2.12	TAGLN	0.44
TFF2	2.10	LTB	0.44
AFP	2.08	FGF18	0.43
SUSD3	2.04	AC104698.1, LBH*	0.43
CHRD2	2.01	AL391319.1, SMOC2*	0.42
DEPP1	0.50	FAM171B	0.42
TPM1	0.50	MYBPH	0.42
COG3	0.50	BASP1	0.42
EDN3	0.50	COTL1	0.41
CCND2	0.50	TFCP2L1	0.40
PPIC	0.49	CDC42EP3	0.39
UTS2	0.49	TUBB3, TUBB3P1*	0.38
ABAT	0.49	MBNL3	0.37
CAB39L	0.49	NRP1	0.36
C12orf75	0.49	KCNJ16	0.35
IGFL2	0.49	ADAM8	0.34
S100A6	0.48	NPPB	0.34
TNNC1	0.48	BIK	0.33
PTGS2	0.48	CAMK1D	0.30
NFE2	0.48	OLR1	0.30
PROCR	0.48	MYL7	0.27
TUBB2B	0.48	SOCS2	0.26
RHOU	0.47	ACTG2	0.26
DPYSL3	0.47	BAMBI	0.24
MYLPF	0.47	ANXA1	0.20
TMSB4XP4	0.46	WNT6	0.18
GPC1	0.46		

HUH7

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
CD133	5.58	UNC5B	2.26
BEX1	5.52	PRSS23	2.26
DMKN	4.82	FERMT1	2.21
BEX2	4.72	TGFB2	2.20
COL2A1	4.64	DNALI1	2.20
EPCAM	4.32	TRPM6	2.18
CRLF1	4.02	CXCL1	2.16
COTL1	3.98	NEO1	2.14
ERP27	3.66	C3orf38	2.11
PLBD1	3.25	ICAM2	2.11
NDRG4	3.24	FOXO1	2.08
TPD52L1	3.15	LHX2	2.08
GCA	3.13	INCENP	2.06
PRKCZ	3.12	SULT1A2	2.06
AC093917.1, GBA3*	3.09	HTRA3	2.05
FSTL1	3.05	CPE	2.04
SLC1A3	3.03	OGT	2.03
TESC	3.00	SLC7A7	2.02
FST	2.96	GPX8	2.02
DKK1	2.89	KITLG	2.02
AUTS2	2.82	SLC6A10P, SLC6A8*	0.49
AC124309.1, MAGEL2*	2.78	MBL2	0.48
KRT15, KRT19*	2.76	C2, CFB*	0.47
SLIT2	2.74	RTN4RL2	0.47
MEST	2.67	C3	0.46

EMC10	2.64	GREM2	0.45
DUSP26	2.55	FGL1	0.40
MAGEA8	2.49	NPTX2	0.40
DPYSL5	2.38	CFH, CFHR1*	0.38
ENPP4	2.38	CSTA	0.33
INPP5D	2.34	NEURL3	0.32
EDN1	2.34	ARG1	0.26
CAND2	2.33	SERPINC1	0.23

БЕЛКИ

НТ-29

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
SEPT2	4.17	PDAP1	2.16
PSMD2	3.60	TBCA	2.10
ARPC5	3.50	THRAP3	2.06
EIF5A	2.89	RPS17	2.03
ALDH1A1	2.88	HIBADH	2.03
RPL31	2.84	MTAP	2.02
BAG2	2.77	UBQLN1	0.49
NDUFS3	2.51	SORD	0.49
RBBP7	2.45	TMSB10	0.48
ANP32E	2.33	TMED9	0.48
RBBP4	2.32	SLC7A5	0.47
DDAH1	2.31	HNRNPAB	0.46
PSMA4	2.29	PODXL	0.46
CAPRIN1	2.26	IDH3A	0.44
PSMD13	2.24	SPINT2	0.43

RUVBL2	2.23	PDCD10	0.40
NUDC	2.23	GGCT	0.40
TMSB4X	2.22		

Сасo2

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
HMGB2	4.25	RPL26	0.47
RPS8	3.81	ALDH2	0.47
EIF4A3	3.53	CNN2	0.46
CLNS1A	2.73	EIF3B	0.46
SPEN	2.59	LAP3	0.46
RPS19	2.55	SURF4	0.45
ETFB	2.53	RPN2	0.45
FH	2.39	TCOF1	0.45
PPME1	2.36	RAB7A	0.44
GLS	2.28	RAB11A	0.44
PSME1	2.22	DAD1	0.44
RPS25	2.20	AGR2	0.42
PARK7	2.17	LMNA	0.41
MAP4	2.14	PHB	0.40
PRPF19	2.10	ELAVL1	0.40
PSMD3	2.04	EIF3G	0.38
NUMA1	2.02	VCL	0.34
CTTN	0.49	TLN1	0.31
EIF4G1	0.49	DBI	0.22
TAGLN	0.48		

HUH7

<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>	<i>Ген</i>	<i>Кратность изменения</i>
LRPPRC	10.26	VIM	2.26
AHNAK	5.51	RAB7A	2.25
RPS28	4.52	TFG	2.24
DDOST	4.19	PSMC1	2.23
IDH1	3.94	SERPINH1	2.21
PRKDC	3.78	TLN1	2.19
MYL12A	3.68	SPTBN1	2.18
YWHAG	3.60	HSD17B4	2.17
PHGDH	3.57	FABP1	2.17
HNRNPL	3.49	ECHS1	2.13
TOMM40	3.42	USP5	2.12
DBI	3.37	VCL	2.11
YWHAЕ	3.20	PRDX4	2.10
RPS3	3.15	HSPA4	2.09
TARDBP	3.04	SRP14	2.09
CKB	3.04	RPN1	2.07
S100A6	2.85	S100P	2.07
PRDX6	2.80	EIF3A	2.06
RPL17	2.77	YWHAQ	2.06
SEC61A1	2.75	PGD	2.02
UCHL1	2.72	TMED9	2.01
RPL10	2.71	APEX1	2.01
ALDH18A1	2.69	TXNRD1	2.01
GLUD1	2.65	TMPO	2.00
FABP5	2.65	AK4	0.50

SPTAN1	2.54	ACAT2	0.49
EEF1B2	2.47	SSBP1	0.48
HNRNPA3	2.45	PCMT1	0.48
SHMT2	2.45	RPS19	0.44
CCAR2	2.44	STMN1	0.42
CALR	2.42	SF3A3	0.42
ACTN4	2.39	NME1-NME2*	0.38
TUFM	2.38	RPL6	0.37
GANAB	2.33	HSPE1	0.35
DPP3	2.31	RPS17	0.35
IMMT	2.31	RPS14	0.32
DDX39B	2.31	TOMM22	0.25
DNM1L	2.26		

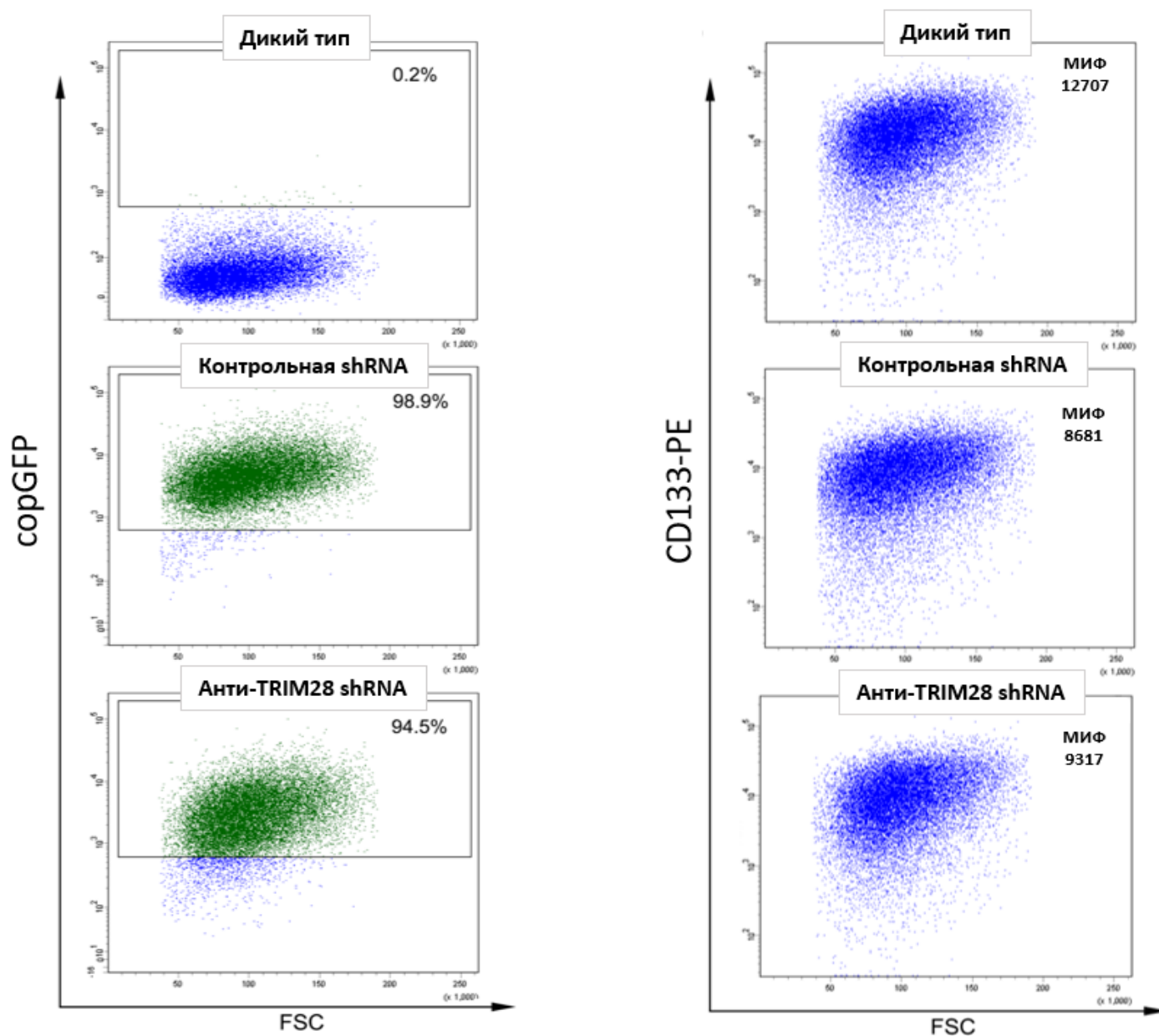
Приложение 5. Список транскрипционных факторов (TFs), мастер-регуляторов (MRs), молекулярных ключевых регуляторов (KRs) и их ранги.

Ген	TFs	MRs	Суммарный ранг	Ген	TFs	MRs	Суммарный ранг
<i>Molecular key regulators</i>				<i>Транскрипционные факторы (продолжение)</i>			
TRIM28	5	5	10	BACH2	2	0	2
RELA	5	3	8	BCL6	2	0	2
MYB	4	4	8	BRCA1	2	0	2
CREB1	4	2	6	CDX2	2	0	2
REST	4	2	6	ESR1	2	0	2
TP53	4	2	6	FOXA2	2	0	2
CEBPA	3	3	6	FOXC1	2	0	2
GABPB1	3	2	5	HMGA2	2	0	2
NANOG	2	2	4	HNF4A	2	0	2
E2F1	2	2	4	HOXD12	2	0	2
E2F3	2	2	4	IKZF2	2	0	2
E2F4	2	2	4	IRF1	2	0	2
E2F7	2	2	4	LEF1	2	0	2
EGR1	2	2	4	MAF	2	0	2
HIF1A	2	2	4	MAFB	2	0	2
HMGA1	2	2	4	MAFG	2	0	2
<i>Транскрипционные факторы</i>				MAFK	2	0	2
GCM2	6	0	6	MEF2A	2	0	2
IKZF1	5	0	5	MEIS1	2	0	2
KLF6	5	0	5	NFE2	2	0	2
BPTF	4	0	4	NFE2L1	2	0	2
CHURC1	4	0	4	NFE2L2	2	0	2
CTCF	4	0	4	NFIA	2	0	2
GLI1	4	0	4	NFIC	2	0	2
GLI2	4	0	4	NR5A2	2	0	2
GLI3	4	0	4	NRF1	2	0	2
GLIS1	4	0	4	PATZ1	2	0	2
GLIS2	4	0	4	PDX1	2	0	2
GLIS3	4	0	4	POU2F1	2	0	2
GTF2IRD1	4	0	4	RBPJ	2	0	2
HLTF	4	0	4	RFX1	2	0	2

KLF4	4	0	4	GABPA	3	0	3
MAZ	4	0	4	GFI1	3	0	3
MZF1	4	0	4	HDX	3	0	3
PBX1	4	0	4	HES1	3	0	3
PBX2	4	0	4	HOMEZ	3	0	3
PBX3	4	0	4	HOXB13	3	0	3
RREB1	4	0	4	HOXC13	3	0	3
SOX2	4	0	4	HSF1	3	0	3
SRY	4	0	4	ADAM10	0	3	3
TCF3	4	0	4	CAPNS1	0	3	3
TFAP2A	4	0	4	CDK2	0	3	3
ZIC1	4	0	4	MAPK3	0	3	3
ZIC2	4	0	4	PTGES	0	3	3
ZIC3	4	0	4	ADAM17	0	2	2
SMAD4	2	0	2	CAMK2A	0	2	2
SRF	2	0	2	CAMK2B	0	2	2
TBX5	2	0	2	CAMK2D	0	2	2
TEAD1	2	0	2	CAMK2G	0	2	2
TFDP1	2	0	2	CHUK	0	2	2
ZBTB16	2	0	2	CSK	0	2	2
ZBTB33	2	0	2	DRD1	0	2	2
<i>Мастер-регуляторные молекулы</i>				DVL2	0	2	2
ZNF263	4	0	4	EGF	0	2	2
DBP	3	0	3	EGFR	0	2	2
ELF1	3	0	3	ERBB2	0	2	2
ELF2	3	0	3	FRAT1	0	2	2
ELF4	3	0	3	GRIN1	0	2	2
ELK1	3	0	3	GSK3B	0	2	2
ELK3	3	0	3	IKBKB	0	2	2
ELK4	3	0	3	IKBKG	0	2	2
ERG	3	0	3	ITGA2B	0	2	2
ETS1	3	0	3	ITGB3	0	2	2
ETS2	3	0	3	MAPK1	0	2	2
ETV4	3	0	3	MAPK11	0	2	2
ETV6	3	0	3	MAPK12	0	2	2
ETV7	3	0	3	MAPK13	0	2	2
FLI1	3	0	3	MLST8	0	2	2

NR5A1	3	0	3	MTOR	0	2	2
POU1F1	3	0	3	NEK7	0	2	2
POU6F1	3	0	3	PASK	0	2	2
SIX1	3	0	3	PKN2	0	2	2
SP1	3	0	3	PTEN	0	2	2
SP3	3	0	3	PTK2	0	2	2
SP4	3	0	3	PTPN12	0	2	2
SPI1	3	0	3	RANBP2	0	2	2
SPIB	3	0	3	RPS6KB1	0	2	2
TFCP2	3	0	3	RPTOR	0	2	2
AIRE	2	0	2	SENP1	0	2	2
BACH1	2	0	2	TNFRSF1A	0	2	2

Приложение 6. Экспрессия репортерного гена *corGFP*, демонстрирующая эффективность лентивирусной трансдукции *shRNA* (левый столбец). Экспрессия *CD133* в трансдуцированных клетках, показывающая отсутствие влияния на нее нокдауна *TRIM28* в линии *Saso2* (правый столбец). Результаты анализа методом проточной цитометрии.



Приложение 7. Верификация нокаута TRIM28 в клетках Caco2 с помощью вестерн блота. Клоны 1-11 – группа клонов с нокаутом TRIM28 (группа «KO»). Клоны 12-29 – группа клонов с непрошедшим нокаутом TRIM28 (группа «Failed KO»). Клоны S1-S9 – клетки, подвергнутые редактированию с использованием gRNA против tagRFP (группа «Ref KO»). Клоны C1-C11 – клоны Caco2 не подвергнутые геномному редактированию (группа «Clones»).

